



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS - CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE UMA MISTURA DE
BIOSURFACTANTES E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLI(OXIETILENO)**

RENATO EISING

ORIENTADOR

PROF. DR. JOSIEL B. DOMINGOS

Florianópolis, fevereiro de 2009

Renato Eising

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE UMA MISTURA DE
BIOSSURFACTANTES E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLI(OXIETILENO)**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em
Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vera L. A. Frescura

Prof. Dr. Santiago F. Yunes

Prof. Dr. Josiel B. Domingos
Orientador

Prof. Dr. Ricardo J. Nunes

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família por todo o amor, dedicação e apoio.

A Silvane pelo seu amor e carinho, e principalmente pelas discussões acerca de mecanismos de reações orgânicas.

Aos pjoteiros pelo nosso jeito de ser, crer e viver.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 205/305 e 303.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram na minha formação.

Aos membros da banca examinadora.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao prof. Dr. Dino Zanette por sua grande contribuição em minha formação e amizade.

Ao orientador prof. Dr. Josiel B. Domingos pela confiança, dedicação, conhecimento transmitido e amizade construída ao longo do tempo.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE GERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
CAPITULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Surfactantes	1
1.2. Micelas	2
1.3. Misturas de Surfactantes	5
1.4. Sais Biliares.....	8
1.5. Polímeros	10
1.6. Interação polímero – surfactante.....	11
1.7. Catálise em meios agregados	12
1.7.1. Catálise micelar.....	12
1.7.2. Catálise por polímeros	13
1.7.3. Reações modelos.....	14
1.8. Definições das Técnicas.....	15
1.8.1. Condutividade Elétrica e Concentração Micelar Crítica (<i>cmc</i>) ...	15
1.8.2. Fluorescência do Pireno	16
1.8.3 Viscosidade	18
RELEVÂNCIA E OBJETIVOS	20
CAPÍTULO II.....	22
PARTE EXPERIMENTAL.....	22
2.1. Materiais e Métodos.....	22
2.1.1. Medidas de pH	23
2.1.2. Método Condutimétrico	23
2.1.3. Viscosidade	24
2.1.4. Método Fluorimétrico	24

2.1.5. Estudos Cinéticos.....	25
CAPÍTULO III	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Condutividade Elétrica.....	27
3.1.1. Medidas na ausência de PEO	27
3.1.2. Medidas em presença de PEO.....	31
3.2. Fluorescência do Estado Estacionário do Pireno	34
3.2.1. Medidas de <i>cmc</i> e <i>cac</i>	34
3.2.2. Micropolaridade	37
3.3. Viscosidade	39
3.4. Tratamento teórico da <i>cmc</i> das Mistura SDoD-NaC	44
3.5. Estudo Cinético	46
3.5.1. Hidrólise do Acetato de <i>p</i> -Nitrofenol.....	47
3.5.2. Desprotonação do 5-Nitrobenzisoaxazol (Reação de Eliminação de Kemp).....	49
3.6. Modelo Micelar para as Mistura SDoD-NaC-PEO.....	52
CAPÍTULO IV	55
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura do surfactante dodecanoato de sódio (SDoD).....	1
Figura 02: Secção transversal de uma micela iônica.....	3
Figura 03: Representação das regiões de uma micela iônica.	4
Figura 04: Perfis típicos obtidos para técnicas mais utilizadas na determinação da cmc.	5
Figura 05: Representação esquemática de uma micela mista de um sal biliar em processos biológicos.....	8
Figura 06: Estrutura molecular do colato de sódio.....	9
Figura 07: Representação do dímero de colato de sódio (ball & stick), formado por interações hidrofóbicas	10
Figura 08: Hidrólise do PNPA.....	14
Figura 09: Reação de desprotonação do 5-nitrobenzisoazol.	15
Figura 10: Perfil de condutividade elétrica vs. [surfactante].....	16
Figura 11: Variação do espectro de fluorescência do pireno com a [surfactante].....	17
Figura 12: Exemplo de um perfil I_1/I_3 vs. concentração de surfactante.	18
Figura 13: A – Exemplos de perfis de η_{rel} e η_{red} vs. [surfactante].	19
Figura 14: Espectro de RMN H^1 do 5-nitrobenzisoazol.....	23

Figura 15: Espectrofotômetro Spectra Max Plus 384 da Molecular Devices e microplacas de 2mL e 300 μ L.....	25
Figura 16: Leitura da absorvância nos 96 poços individuais e regressões não-linear e linear para uma cinética típica deste trabalho.	26
Figura 17: Gráfico de condutividade específica vs. [SDoD].	28
Figura 18: Gráfico de condutividade específica vs. [NaC].....	29
Figura 19: A – Perfil de condutividade específica vs. [surfactante] da fração 0,6 de SDoD. B – Perfil de condutividade equivalente vs. raiz quadrada da [surfactante] da fração molar 0,6 de SDoD.....	30
Figura 20: Gráfico de condutividade específica vs. [SDoD] em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO.	32
Figura 21: Gráfico de condutividade específica vs. [NaC] em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO.	33
Figura 22: Perfis de condutividade equivalente vs. raiz quadrada [surfactante] para diferentes frações molares de SDoD–NaC em presença de PEO.....	33
Figura 23: Variação da cmc ou cac da mistura SDoD–NaC em função da [PEO].....	34
Figura 24: Razão das intensidades das bandas I ₁ e I ₃ do espectro de fluorescência do pireno vs. [SDoD] na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO.	35
Figura 25: Razão das intensidades das bandas I ₁ e I ₃ do espectro de fluorescência do pireno vs. [NaC] na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO.....	36
Figura 26: Razão das intensidades das bandas I ₁ e I ₃ do espectro de fluorescência do pireno vs. [surfactante] da fração molar 0,9 de SDoD na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO.	36

Figura 27: Valores de cmc e cac em função da fração molar de SDoD obtidas por fluorescência do pireno, na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO	37
Figura 28: Perfis da razão I ₁ /I ₃ dos espectros de fluorescência do pireno em função da fração molar de SDoD na ausência e em presença de 50mmolL ⁻¹ de PEO	38
Figura 29: Viscosidade relativa vs. [SDoD] na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO	40
Figura 30: Viscosidade relativa vs. [NaC] na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO	42
Figura 31: Variação da cmc experimental de misturas de NaC e SDoD segundo a teoria da solução ideal e segundo a teoria da solução regular (RST), para diferentes valores de β, em função da fração molar de SDoD.	45
Figura 32: Variação da composição monomérica das micelas mistas segundo a teoria da solução ideal (linha pontilhada) e segundo a teoria da solução regular (linha contínua) em função da fração molar total de SDoD na solução.....	46
Figura 33: Perfis de <i>k_{obs}</i> vs. χ_{SDoD} na ausência e em presença de 50 mmolL ⁻¹ de PEO, para PNPA	48
Figura 34: <i>k_{obs}</i> vs. [PEO] para a hidrólise do PNPA.....	49
Figura 35: Perfis de <i>k_{obs}</i> vs. χ_{SDoD} na ausência e em presença de 50 mmolL ⁻¹ de PEO, para 5-NBI	50
Figura 36: Grau de ionização micelar e <i>k_{obs}</i> em 80mmolL ⁻¹ de surfactante vs. χ_{SDoD}	52
Figura 37: Representação esquemática para estruturas mistas NaC-SDoD e NaC-SDoD-PEO em função da fração molar de surfactante.	54

INDICE DE TABELAS

Tabela 01: Classificação de surfactantes de acordo com o tipo de cabeça.	2
Tabela 02: Valores de concentração micelar crítica (cmc), concentração de pré-agregação (cpa), e dos coeficientes angulares obtidos a partir de gráficos de condutividade elétrica, para diferentes misturas de SDoD-NaC.	31
Tabela 03: Valores de concentração micelar crítica (cmc) na ausência e em presença de 50 mmol L ⁻¹ de PEO via viscosidade relativa.	43

ABREVIATURAS

SDoD	Dodecanoato de Sódio
NaC	Colato de Sódio
PEO	Poli(oxietileno)
<i>cmc</i>	Concentração Micelar Crítica
<i>cac</i>	Concentração de Agregação Crítica
<i>psp</i>	Ponto de Saturação do Polímero
<i>cpa</i>	Concentração de Pré-Agregação
S_{11}	Coefficiente Angular do Perfil de Condutividade Especifica abaixo da <i>cpa</i>
S_{12}	Coefficiente Angular do Perfil de Condutividade Especifica entre a <i>cpa</i> e a <i>cmc</i>
S_3	Coefficiente Angular do Perfil de Condutividade Especifica acima da <i>cmc</i>
α	Grau de ionização micelar
κ	Condutividade Específica
S	Siemes (unidade de condutividade)
[]	Concentração
I_1	Intensidade de Fluorescência do Pireno obtido em 372,8 nm
I_3	Intensidade de Fluorescência do Pireno obtido em 384,0 nm
β	Parâmetro Empírico de Interação
PNPA	Acetato de <i>p</i> -nitrofenila
5-NBI	5-nitrobenzisoaxazol
η	Viscosidade
η_{rel}	Viscosidade Relativa
η_{red}	Viscosidade Reduzida
χ	Fração Molar

λ°	Condutividade Molar a Diluição Infinita
Abs	Absorbância
Abs _{inf}	Absorbância no tempo infinito
k_{obs}	Constante de Velocidade de Reação Observada

RESUMO

Investigou-se as propriedades da mistura de surfactantes dodecanoato de sódio e colato de sódio (SDoD–NaC) na ausência e em presença de poli(oxietileno) (PEO) em tampão tris(hidroximetil)-aminometano Tris/HCl 20mmol L⁻¹ a 25,0 °C e pH 9,00 por meio de medidas de condutividade elétrica, viscosidade, fluorescência do pireno e cinéticas de reação do acetato de *p*-nitrofenila (PNPA) e 5-nitrobenzisoxazol (5-NBI). As medidas dos parâmetros de associação, concentração micelar crítica (*cmc*), concentração de agregação crítica (*cac*), ponto de saturação do polímero (*psp*) e outras características como a inclinação nos perfis de condutividade, o efeito da concentração do polímero no parâmetro *cac*, e microambientes micelares foram aqui investigadas. Os resultados foram expressos em termos de gráficos de condutividade específica, condutividade equivalente, viscosidade relativa e razão das intensidades das bandas 1 e 3 do espectro de fluorescência do pireno *vs.* a concentração de surfactante. Teorias baseadas em conceitos de micelização de mistura de surfactantes foram aplicadas para simular a variação da *cmc* em função da mistura. Através das técnicas utilizadas neste trabalho não se observou diferença no resultados na ausência e em presença de PEO em concentrações abaixo de 30mmolL⁻¹ de NaC, onde há predomínio de micelas primárias. Acima de 30mmolL⁻¹, com formação de micelas secundárias, há interação NaC e PEO. Com a adição de SDoD à mistura conclui-se que independente da concentração de PEO a formação dos complexos mistos SDoD–NaC–PEO ocorre somente em frações molares acima de 0,9 de SDoD. As cinéticas de reação de ambos os substratos utilizados mostraram sensibilidade aos diferentes agregados micelares SDoD-NaC.

Palavras-chave: biossurfactantes; interação polímero-surfactante; sais biliares.

ABSTRACT

The properties of the surfactants mixtures sodium dodecanoato and sodium cholate (SDoD-NaC) had been investigated in absence and presence of PEO in 20mmolL^{-1} tris(hydroxymethyl)-aminemethane Tris/HCl buffer, 25°C and pH 9,00, by means of electrical conductivity, viscosity, pyrene fluorescence and reaction kinetics of the *p*-nitrophenyl acetate (PNPA) and 5-nitrobenzoxazole (5-NBI). The measures of association parameters, critical micelle concentration (*cmc*), critical aggregation concentration (*cac*), polymer saturation point (*psp*), as well the determination of other important physicochemical characteristics, such the slopes of the electrical conductivity profiles, the polymer concentration effect in the *cac* parameter, micelle's microenvironment, had been conducted. Theories based in the micellization concepts of the surfactant mixtures had been used to simulate *cmc* variation as a function of the mixtures composition. The studies of these surfactants systems performed in the absence and presence of PEO had not shown significantly differences in the results at concentrations of NaC below of 30mmolL^{-1} , with a typical predominance of the primary micelles. However, above 30mmolL^{-1} , it was observed formation of the secondary micelles, resulted from interaction between NaC and PEO. With the addition of SDoD to the mixture, independently of the PEO concentration, the formation of the mixing complexes SDoD-NaC-PEO only occurs in molar fractions above 0,9 of SDoD. Kinetics of the reactions for both substrates used in this work had shown to have great sensitivity of the medium and presented to be an interesting probe regarding SDoD-NaC micelle aggregation.

Keywords: biosurfactants; polymer-surfactant interaction; bile salts.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

1.1. Surfactantes

Surfactantes são compostos químicos que possuem em sua estrutura molecular pelo menos duas regiões distintas (Fig. 01), uma hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar). Cada uma das regiões possui afinidade com substâncias diferentes, a hidrofílica com a água, por exemplo, e a hidrofóbica com gorduras [1, 2].

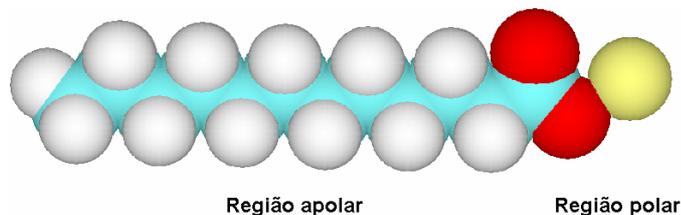
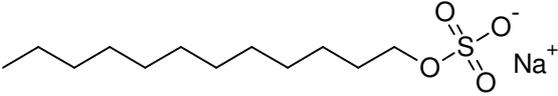
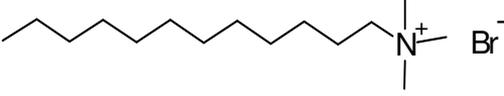
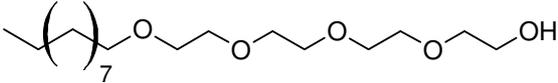
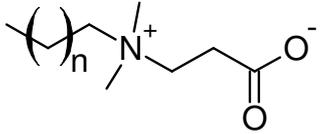


Figura 01: Estrutura do surfactante dodecanoato de sódio (SDoD).

Conhecidos popularmente como sabões e detergentes, os surfactantes são compostos de superfície ativa (tensoativos), ou seja, sua propriedade fundamental é a tendência de acumular-se em interfaces[3]. Por causa da capacidade e tendência de adsorverem-se em interfaces ar-água, óleo-água, em polímeros produzindo estruturas ordenadas e em sólidos conferindo melhoramento de propriedades de materiais para fins práticos e industriais, eles são utilizados em inúmeras formulações de produtos comerciais, onde podem estar presentes diferentes tipos de interfaces. Exemplos familiares são as tintas a base de água, detergentes e materiais de limpeza. Sob o ponto de vista coloidal, eles formam sistemas estruturalmente complicados porque podem conter em equilíbrio ambas as interfaces, sólido-líquida (quando tem partículas de pigmento dispersas) e líquido-líquida (látex). Assim, a tendência em acumular-se em interfaces é a propriedade fundamental dos surfactantes.

Os surfactantes são classificados de acordo com a natureza do grupo hidrofílico, como mostra a Tabela 1.

Tabela 01: Classificação de surfactantes de acordo com o tipo de cabeça.

Surfactante	Estrutura	Classificação
Dodecilsulfato de sódio (SDS)		Aniônico
Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB)		Catiônico
Mono <i>n</i> -dodecil éter tetra-etileno glicol		Não-iônicos
Propionato de <i>N</i> -alquil- <i>N,N</i> - dimetil- β -amônio		Zwitteriônico

Os agregados formados por surfactantes tais como micelas, vesículas, monocamadas e complexos polímero-surfactante são amplamente estudados porque possuem interfaces anisotrópicas que separam uma região aquosa, portanto hidrofílica, de uma região hidrofóbica cujas características são tipicamente de um óleo. O relevante aspecto destas interfaces é de que elas podem controlar propriedades físicas e induzir mudanças de reatividade química e biológica. Estes sistemas têm sido usados com frequência para mimetizar reações químico-biológicas uma vez que, essencialmente *in vivo*, as reações ocorrem em interfaces, e eles constituem sistemas menos complexos do que membranas biológicas [4].

1.2. Micelas

Uma das características comum a todos os surfactantes, é a capacidade de formar agregados em solução aquosa a partir de uma determinada concentração, conhecida como concentração micelar crítica (*cmc*). Estes agregados são denominados micelas. As micelas podem assumir diversas formas dependendo da estrutura do surfactante, da composição do sistema e da concentração [5]. Este fenômeno ocorre induzido por forças hidrofóbicas, a alta organização das moléculas de água que promovem a associação das cadeias carbônicas do surfactante.

Em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (*cmc*), as moléculas de surfactante encontram-se preferencialmente na forma de monômeros, no entanto, em concentrações próximas da *cmc*, inicia-se um equilíbrio entre micelas e monômeros.

Há muita discussão quanto à estrutura das micelas, mas muitos pesquisadores concordam que estas assumem um formato esférico quando a concentração de surfactante não ultrapasse em muitas ordens de magnitude da *cmc*. As micelas possuem dimensões coloidais e em solução aquosa as cadeias carbônicas apontam para o interior e as cabeças polares se situam na superfície da esfera. A Figura 02 mostra um modelo de micela aquosa esférica.

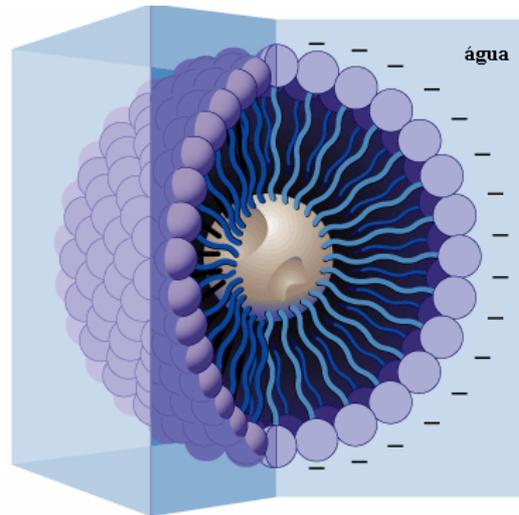


Figura 02: Secção transversal de uma micela iônica, com uma gotícula de óleo dissolvida em seu interior.[6]

Em solventes polares também ocorre a formação de micelas. Neste caso, os agregados são chamados de micelas reversas. Nestas micelas, a cabeça polar situa-se no interior e, por esta razão, as moléculas organizam-se de tal forma que, no interior, forma-se um grupo central hidrofílico [7].

As micelas aquosas apresentam as seguintes características:

- i. São esféricas com raio aproximadamente igual ao comprimento da cadeia carbônica.
- ii. Possuem em torno de 50 a 100 unidades monoméricas (íons ou moléculas de surfactante).
- iii. O processo de micelização ocorre em uma faixa estreita de concentração.
- iv. Com surfactantes iônicos, muitos contra-íons são ligados à superfície da micela reduzindo assim a repulsão eletrostática entre as cabeças.
- v. O interior das micelas tem, essencialmente, as propriedades de um solvente orgânico apolar e isto confere à micela a habilidade de solubilizar moléculas apolares.
- vi. Um núcleo formado pela parte apolar, cuja cadeia carbônica pode ter de 8 a 18 átomos de carbono.

- vii. Uma região muito hidratada conhecida por camada de Stern (Figura 03) formada pela parte polar da molécula e pelos contra-íons, quando a micela for iônica.
- viii. Para micelas iônicas, uma dupla camada elétrica difusa chamada de Camada de Gouy Chapman que contém os contra-íons restantes e se estende até a fase aquosa.[8]

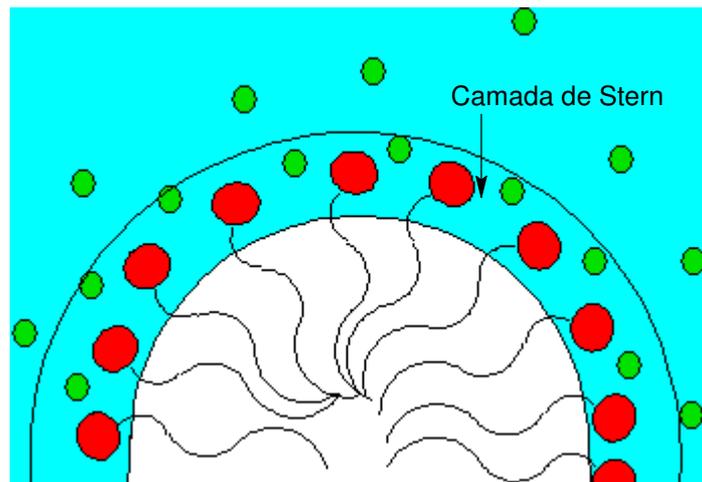


Figura 03: Representação das regiões de uma micela iônica.

Surfactantes iônicos, em baixas concentrações, comportam-se como eletrólitos fortes. Com o aumento da concentração, ocorre a auto-associação de monômeros formando agregados micelares. Esta concentração é denominada *cmc* e é a menor concentração de surfactante em que se formam micelas, ou a solubilidade máxima do monômero em água. O valor da *cmc* é fortemente influenciado pela hidrofobicidade da cadeia carbônica, natureza do grupo polar, contra-íon e tipo e concentração de eletrólito adicionado à solução. A temperatura exerce pouca influência [8]. Assim, cada surfactante tem uma *cmc* que depende das condições experimentais.

Várias técnicas podem ser empregadas na determinação da *cmc*. Algumas delas são mostradas na Figura 04. A *cmc* normalmente é definida como um ponto, embora as mudanças na propriedade medida ocorram em uma faixa de concentração. O valor determinado para a *cmc* depende da técnica e deste modo é importante sempre associar os valores às técnicas utilizadas nas medidas.

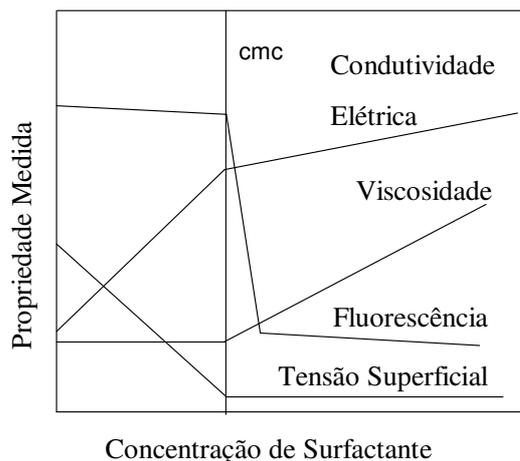


Figura 04: Perfis típicos obtidos para técnicas mais utilizadas na determinação da *cmc*.

1.3. Misturas de Surfactantes

Misturas de surfactantes são utilizadas em muitas aplicações práticas devido ao baixo custo, comparativamente àqueles com surfactantes puros, além de favorecer a formação de materiais com propriedades físico-químicas superiores (sinergismo) do que quando aplicados individualmente.

Em solução aquosa, a distribuição de cada surfactante na fase micelar e na fase monomérica varia de acordo com a estrutura do surfactante e com a composição total da solução. Misturas de surfactantes que pertencem à mesma classe hidrofílica e hidrofóbica, possuem propriedades que podem ser previstas a partir de propriedades dos componentes individuais. Tal mistura é chamada de *sistema ideal*. Considerando a micela como uma fase condensada, em equilíbrio com seu monômero dissociado, considerado a fase gasosa, a *cmc* é considerada a pressão de vapor do sistema, sendo este tratamento chamado de *modelo da pseudofase*. Logo, a *cmc* está para o equilíbrio monômero-micela assim como a pressão de vapor está para o equilíbrio líquido-vapor. Então a *cmc* é intermediária a cada um dos surfactantes puros, processo análogo à variação da pressão de vapor de uma mistura ideal de líquidos.

A formação de agregados micelares mistos mais simples é aquela quando ocorre sem interações resultantes entre as espécies de surfactantes micelizados. Numa mistura binária formada pelos surfactantes A e B, a *cmc* da mistura de um sistema ideal pode ser determinada pela fração molar de um dos componentes da mistura e a *cmc* dos surfactantes individuais, conforme mostra a Equação 01, [9-11]

$$cmc_{ideal} = \frac{cmc_A cmc_B}{\chi_A cmc_B + \chi_B cmc_A} \quad \text{Equação 01}$$

onde, cmc_{Ideal} é a concentração micelar crítica segundo a teoria da solução ideal, cmc_A e cmc_B referem-se às cmc dos surfactantes A e B, respectivamente, e χ_A e χ_B são a frações molares dos surfactantes A e B na solução, respectivamente. Sistemas que obedecem a equação 1 são chamados de sistemas ideais, e normalmente são constituídos por surfactantes que pertencem a mesma classe, como catiônicos com catiônicos, por exemplo [12].

A Equação 2 pode ser usada para estimar a composição das micelas mistas que seguem a teoria da solução ideal na forma de fração molar dos monômeros em qualquer mistura, onde x_A é a fração de monômeros do surfactante A na micela e χ_A fração molar do surfactante A na solução.

$$x_A = \chi_A \frac{cmc_{ideal}}{cmc_A} \quad \text{Equação 02}$$

Para misturas que formam sistemas não-ideais, sendo geralmente misturas de surfactantes constituídos por diferentes classes hidrofílicas ou hidrofóbicas, tais como misturas de catiônicos com aniônicos ou cada um destes com surfactantes não iônicos, o tratamento matemático torna-se mais complexo. Para estes sistemas não-ideais, o *modelo da pseudofase* também pode ser aplicado mas, neste caso, são usadas as equações da teoria das soluções regulares [9-11] e as interações surfactante/surfactante devem ser consideradas assim como os coeficientes de atividade. O modelo requer um parâmetro empírico para prever o comportamento observado.

Estas misturas geralmente mostram desvios negativos da idealidade. Logo, a cmc observada, é menor do que aquela prevista pela Equação 01. Assim, se a interação entre os surfactantes A e B na micela mista pode ser descrita pelo modelo da aproximação regular da solução, a Equação 03 [10, 11] fornece as informações sobre o comportamento da formação de micelas mistas que apresentam desvios da idealidade. A Equação 03 prevê a composição da micela mista, ou seja, a fração molar de cada surfactante na micela, onde cmc_{Exp} é a concentração micelar crítica experimental para uma mistura de surfactante.

$$\chi_A^2 \ln \left(\frac{cmc_{exp} \chi_A}{cmc_A x_A} \right) = (1 - x_A)^2 \ln \left[\frac{cmc_{exp} (1 - \chi_A)}{cmc_B (1 - x_A)} \right] \quad \text{Equação 03}$$

O parâmetro empírico de interação (β) é atribuído às interações surfactante/surfactante e é relacionado à entalpia de formação da micela. Se a cmc da mistura é conhecida, as Equações 3 e 4 podem ser usadas para determinar β e, então, o modelo pode prever o equilíbrio monômero-micela. De outro lado, se forem conhecidos os valores de cmc para várias frações molares da mistura, utiliza-se o valor médio de β .

$$\beta = \frac{\ln\left(\frac{cmc_{\text{exp}} \cdot x_A}{cmc_A \cdot x_A}\right)}{(1 - x_A)^2} \quad \text{Equação 04}$$

O parâmetro β indica se há sinergismo ($\beta < 0$) ou antagonismo ($\beta > 0$) nas interações dos surfactantes [10]. Com os valores de β determinados, pode-se calcular os coeficientes de atividade f_A e f_B para os surfactantes A e B respectivamente, de acordo com as Equações 5 e 6.

$$f_A = \exp[\beta(1 - x_A)^2] \quad \text{Equação 05}$$

$$f_B = (\beta \cdot x_A^2) \quad \text{Equação 06}$$

Então, com a Equação 7, determina-se o valor da cmc_{Reg} que é a concentração micelar crítica segundo a teoria da solução regular para qualquer fração molar da mistura.

$$\frac{1}{cmc_{\text{reg}}} = \frac{x_A}{f_A \cdot cmc_A} + \frac{x_B}{f_B \cdot cmc_B} \quad \text{Equação 07}$$

De acordo com a teoria, quanto mais negativo for o valor de β , maior o desvio do comportamento ideal na formação da micela mista. De outro lado, quando $\beta = 0$, o sistema é ideal e as Equações 7 e 3 reduzem-se para 1 e 2, respectivamente.

O desvio da idealidade para misturas binárias de surfactantes aumenta na seguinte ordem: catiônico/não-iônico < aniônico/não-iônico < aniônico/catiônico [11]. Os valores médios de β encontrados na literatura são: catiônico/não-iônico = - 2,7, aniônico/não-iônico = - 3,4 e para aniônico/catiônico = - 19,0 [11].

Uma interpretação físico-química apresentada para o mecanismo da formação não ideal é que, quando um surfactante não-iônico é misturado com um iônico, os grupos hidrofílicos do não-iônico separam as cargas do iônico reduzindo a repulsão eletrostática da Camada de Stern. Portanto, a densidade de carga na superfície da micela é reduzida. Assim,

precisa-se de menos trabalho para inserir um monômero de surfactante iônico na micela mista do que na micela iônica pura porque a repulsão elétrica é menor. Este efeito de separação das cargas favorece a formação de micelas mistas e o valor da *cmc* é menor que no caso de micelas mistas ideais. Baseando-se nesta premissa, no caso de micelas contendo misturas de aniônico e catiônico, espera-se que a atração eletrostática faça com que a *cmc* diminua muito mais acentuadamente.

1.4. Sais Biliares

Sais biliares são biossurfactantes sintetizados no fígado, via oxidação do colesterol, e são transportados através da bÍlis para o intestino. Em humanos, a produção diária de sais biliares, está em torno de 20 g. Dispersados em fase aquosa, os sais biliares podem formar uma variedade de diferentes agregados e estruturas micelares. A forma dos agregados depende de fatores como concentração do surfactante, natureza química, pH e temperatura. Micelas de sais biliares são capazes de incorporar lípídeos e moléculas anfífilicas formando, assim, micelas mistas (Fig. 05). Esta habilidade de solubilização é de fundamental importância na absorção intestinal dos produtos da digestão de gorduras, como ácidos graxos, monoglicéridios e vitaminas.[13, 14]

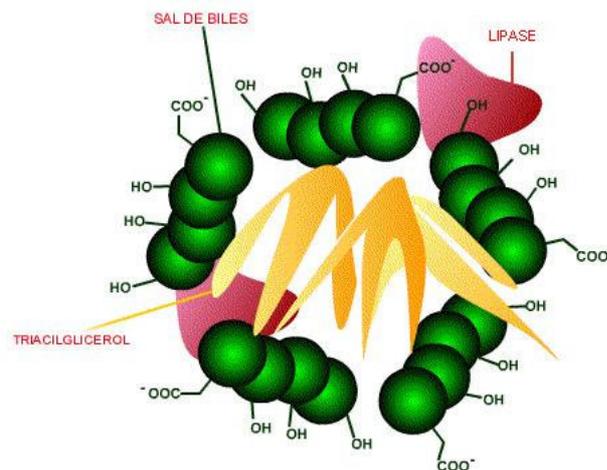


Figura 05: Representação esquemática de uma micela mista de um sal biliar em processos biológicos.[6]

Devido a sua particular estrutura e da rigidez da molécula, os processos de associação e agregação são totalmente diferentes dos surfactantes aniônicos clássicos. A Figura 06 mostra a estrutura do sal biliar colato de sódio. Note que os grupos polares estão voltados para a mesma face da estrutura.

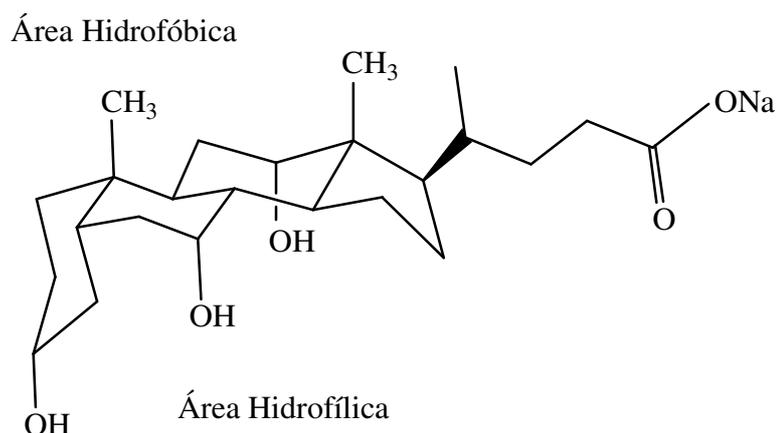


Figura 06: Estrutura molecular do colato de sódio.

Desde que Roepke e Mason [15] evidenciaram que sais biliares associam-se para formar micelas, muitos trabalhos têm-se dedicado ao entendimento do processo de micelização utilizando diversas técnicas e condições experimentais [16, 17], no entanto, isto ainda é assunto de alguma controvérsia. A simples busca por parâmetros como *cmc*, número de agregação, mecanismo de auto-associação e morfologia pode dar idéia do contraste de opiniões [17-21]. Small e colaboradores [18], com base em dados de ressonância magnética nuclear (rmn), propuseram que os sais biliares formavam micelas primárias e secundárias. Ele concluiu que, na *cmc*, são formadas apenas micelas pequenas com até dez monômeros, induzidas por interações hidrofóbicas entre as partes apolares das moléculas. Com o aumento da concentração, micelas maiores (secundárias) são formadas por ligações de hidrogênio dos grupos hidroxilas localizadas na face externa das micelas primárias.

Vários autores questionaram as idéias de Small. Para Oakenfull e Fisher [19] são as ligações de hidrogênio as responsáveis pela formação das micelas primárias. Kratochvil e colaboradores [21], por meio de medidas de espalhamento de luz, propõem que o processo de micelização em baixas concentrações se dá por ligações de hidrogênio (micela primária) e em altas concentrações por interações hidrofóbicas. A Figura 07 mostra a estrutura do dímero de colato de sódio sendo formado por interações hidrofóbicas, conforme proposta de Small. [22]

Entende-se que o escopo de compreender e interpretar os resultados de possíveis interações com polímeros é uma forma de mimetizar as funções dos sais biliares *in vivo*.

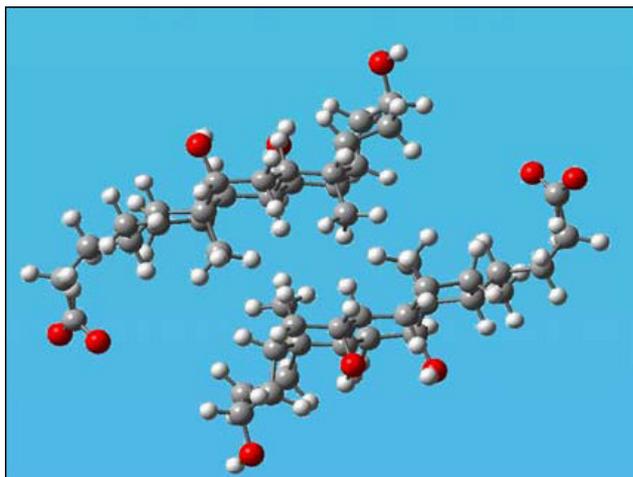


Figura 07: Representação do dímero de colato de sódio (ball & stick), formado por interações hidrofóbicas.[6]

1.5. Polímeros

A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Polímeros são compostos de alta massa molecular relativa, macromoléculas, formadas por unidades estruturais menores e repetitivas, os monômeros, conectadas por ligações covalentes. São caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Podem ser naturais como a seda, a celulose e as fibras de algodão, ou sintéticos como o polipropileno (PP), o poli(tereftalato de etileno) (PET), e o poli(cloreto de vinila) (PVC).[23-25]

A utilização de polímeros pela humanidade vem desde a antiguidade, quando materiais resinosos e graxas eram extraídas por egípcios e romanos para seu uso em carimbos, colar documentos e vedar vasilhames. No século XVI, com o advento dos descobrimentos, espanhóis e portugueses tiveram o primeiro contato com o produto extraído de uma árvore natural das Américas (*Havea brasiliensis*). Esse extrato, produto da coagulação e secagem do látex, apresentava alta elasticidade e flexibilidade desconhecida até então. Ao ser levada a Europa, adquiriu o nome de borracha pela sua capacidade de apagar marcas de lápis. Sua utilização foi bem restrita até a descoberta da vulcanização por *Charles Goodyear*, em 1839. Em 1846 o químico alemão *Christian Schönbién*, deu origem a nitrocelulose, sendo o primeiro polímero semi-sintético. Em 1912 foi produzido o primeiro polímero sintético por *Leo Baekeland*, obtido pela reação entre fenol e formaldeído, resultando em um produto sólido conhecido hoje por “*bakelite*”. Desde então, a indústria e o uso de polímeros não para de crescer e hoje em dia fazem parte do nosso cotidiano [25].

1.6. Interação polímero – surfactante

Em solução aquosa, polímeros e surfactantes podem associar-se para formar complexos termodinamicamente estáveis, com propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas em soluções micelares [26]. A associação de surfactantes aniônicos com polímeros, geralmente ocorre em concentrações mais baixas do que quando na ausência deles. A associação é vista como sendo um fenômeno induzido pelo polímero [27-31].

É de compreensão geral que a formação de micro-superfícies de agregados que contêm anfífilos é induzida, primeiramente por efeitos hidrofóbicos dos componentes no processo [6]. As organizações de componentes no sítio ativo de enzimas, ligação e organização local em superfícies de membranas biológicas, por exemplo, dependem das interações específicas entre íons, moléculas e estas superfícies. O conhecimento da composição e das propriedades micro-interfaciais tem trazido, já no passado, entendimento e explicação de como surfactantes ou outros anfífilos controlam a velocidade de reações químicas e a distribuição quantitativa de produtos.

O estudo da formação de complexos entre polímeros e surfactantes encontra particular interesse na área da pesquisa acadêmica, uma vez que é um modelo mimético das associações e interações que acontecem *in vivo* entre proteínas e membranas celulares.

À parte do interesse no uso como modelo de sistemas biológicos, a indústria tem uma ampla aplicação de produtos comerciais onde polímeros e surfactantes estão misturados para conferir propriedades adequadas de inúmeras formulações. Assim, recentemente, as pesquisas têm focado os aspectos moleculares da interação para entender diagramas de fase e as propriedades reológicas [27]. A mais ampla aplicação industrial é, sem dúvida, em emulsões de modo em geral, estendendo-se em importantes áreas como em alimentos, tintas, cosméticos, têxteis e em micro emulsões como veículo para dissolver componentes com diferentes solubilidades e até para recuperação terciária de petróleo [32].

Os efeitos resultantes da combinação de polímeros e surfactantes são sinérgicos, isto é, os componentes associados conferem o aprimoramento de propriedades quando comparados a estes individualmente [33]. Por exemplo, a mistura promove a diminuição da *cmc* quando comparada com o valor para o surfactante puro, assim é possível preparar formulações em concentrações menores resultando na redução da quantidade de surfactante mínima para sua operacionalidade e com o melhoramento prático de formulações. Outro exemplo está em formulações contendo polímeros solúveis em água com corantes e/ou aditivos insolúveis em água, que podem ser utilizados quando em presença de surfactantes,

devido ao complexo polímero – surfactante formado ter propriedades semelhantes às micelas aquosas de surfactante, amplamente conhecidas pela capacidade de dissolver substâncias insolúveis em meio aquoso.

A interação polímero-surfactante pode ser estudada utilizando-se as mesmas técnicas empregadas para determinação da *cmc* (seção 1.2). A formação de agregados polímero-surfactante é observada pelo aparecimento de discontinuidades nos perfis em concentrações de surfactante diferentes da *cmc*. Essas discontinuidades são denominadas de *concentração de agregação crítica (cac)* e *ponto de saturação do polímero (psp)*.

O primeiro ponto de discontinuidade, *cac*, é interpretado como sendo o início da associação cooperativa entre polímero e surfactante e ocorre em concentrações abaixo da *cmc*. A região entre a *cac* e *psp* é aceita e definida como a etapa de formação dos agregados, que se encerra no *psp* onde ocorre a saturação da cadeia polimérica pelo surfactante e a formação de micelas livres e ocorre em concentrações acima da *cmc* do surfactante.

1.7. Catálise em meios agregados

In vivo, enzimas exercem papel fundamental em diversas reações, e sem sombra de dúvida são os melhores e mais eficientes sistemas catalíticos. Apesar de enzimas serem os melhores “reatores” químicos conhecidos, sua aplicação *in vitro* ou comercial é difícil devido sua complexidade estrutural e grande dependência do meio para sua forma ativa ser mantida [34].

Como alternativa tem-se grande interesse em sistemas constituídos por polímeros, surfactantes e suas misturas, pois estes sistemas mimetizam condições *in vivo* e possuem grau de complexidade menor do que sistemas enzimáticos de membranas.

O entendimento de reações químicas em sistemas formados por polímeros e surfactantes pode, portanto, ajudar na elucidação do mecanismo de tais enzimas, o que atrai interesse tanto do ponto de vista acadêmico e biológico quanto do ponto de vista industrial.

1.7.1. Catálise micelar

Catálise micelar é o termo utilizado para definir a área de conhecimento relacionada aos fenômenos de aceleração ou inibição de reações químicas que ocorrem em presença de surfactantes.

A diferença de polaridade entre a superfície hidrofílica da micela e seu interior hidrofóbico lhe confere a capacidade de solubilizar tanto reagentes polares quanto apolares

presentes na fase aquosa e assim influenciar na velocidade da reação [35-37]. Quando ocorre incremento na velocidade da reação, este pode ser resultado de um de quatro efeitos ou suas combinações [35]:

- i. aumento na concentração local dos reagentes na pseudofase micelar;
- ii. estabilização do estado de transição da reação devido a formação de interações favoráveis com as moléculas de surfactante, e/ou efeito pré-orientacionais da micela ao solubilizar substratos em uma posição específica;
- iii. efeitos combinados de polaridade, microviscosidade e carga no interior da pseudofase micelar.
- iv. grupos reativos junto a cabeça polar do surfactante ou mesmo a própria cabeça do surfactante, as chamadas micelas funcionais.

Reações de compostos orgânicos em água na presença de surfactantes têm sido estudadas por décadas, [38, 39] porém durante muito tempo ficaram limitadas a reações simples como hidrólise de ésteres [40-42]. No entanto, vale ressaltar a utilização de surfactantes em reações de polimerização ainda na década de 40 [43], e em 1975 o primeiro trabalho com surfactantes em síntese orgânica foi publicado por Menger e colaboradores [44]. Recentemente reações de oxi-redução têm sido estudadas em presença de surfactantes, mostrando que estes têm papel fundamental em tais conversões visto que na sua ausência a reação não acontece [35, 45, 46].

1.7.2. Catálise por polímeros

Polímeros são macromoléculas com grande variedade de composição, forma, tamanho, dispersão, etc., e sua aplicabilidade em determinadas áreas dependem destas propriedades. Isto tem feito dos polímeros uma classe atrativa de compostos para diversas aplicações, inclusive como micro reatores ou nano reatores [35].

A utilização de polímeros como micro ou nano reatores pode ser como simples macromoléculas ou estruturas auto-organizadas. Copolímeros constituídos de blocos anfifílicos, construídos com pelo menos dois blocos de diferentes propriedades, tendem a formar estruturas organizadas em solução, semelhantemente ao que acontece com surfactantes tradicionais, podendo formar estruturas como micelas, bicamadas e outras arquiteturas, [35, 47-49]. As aplicações destes tipos de estruturas em solução vão desde o encapsulamento de enzimas, melhorando suas atividades catalíticas, ao controle do crescimento de nano partículas metálicas [50, 51]. No entanto, devido a sua natureza dinâmica, micelas poliméricas

se tornam sensíveis às condições experimentais. Em contra partida, sistemas covalentes como dendrímeros, polímeros ramificados e polímeros estrelados, têm sido utilizados para resolver este problema, e encontram grande aplicabilidade como estabilizantes na formação de nano partículas, recuperação de catalisadores metálicos, nano reatores e desenvolvimento de enzimas artificiais (*synzymes*) [35, 52].

1.7.3. Reações modelos

Uma reação química, em muitos casos, não é objeto de fácil estudo. Vários substratos possuem dificuldades de manipulação, de acesso e/ou podem ser tóxicos, explosivos ou, ainda, simplesmente não haver um meio simples de se acompanhar a reação. Quando um substrato de interesse apresenta estes inconvenientes, a solução mais prática é, sem dúvida, a utilização de uma reação modelo. Esta deve apresentar as características da reação de interesse, como estrutura similar ao substrato que se pretende mimetizar e ser de fácil monitoração.

Reações modelos também podem ser empregadas para testar as propriedades de um determinado catalisador. Ao mesmo tempo em que as propriedades básicas do material são avaliadas, o potencial de aplicação do catalisador básico também é evidenciado. As reações utilizadas para caracterização das propriedades ácido-básicas dos catalisadores devem apresentar características particulares, como por exemplo, apresentar uma rota reacional conhecida. Desta forma é possível identificar a função de cada sítio (ácido ou básico) na formação dos produtos [53].

A hidrólise de ésteres ativados (fig. 08), como o acetato de *p*-nitrofenila (PNPA), é uma reação modelo largamente estudada para hidrólise de ésteres [41, 54-57]. Grande parte dos estudos com este tipo de reação se dá com modelos enzimáticos. O mecanismo de ação hidrolítica de enzimas, como a α -chymotripsina, foram um dos primeiros a serem elucidados [58-61].

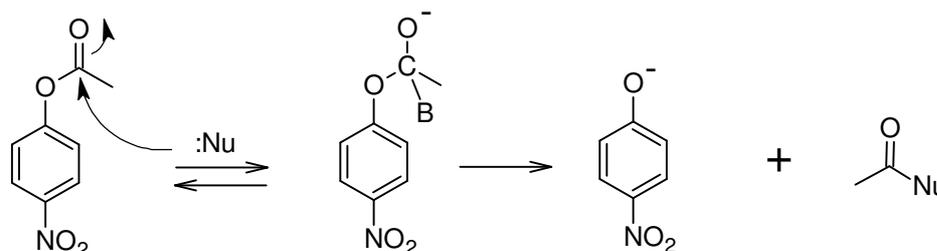


Figura 08: Hidrólise do PNPA.

Após a caracterização mecanística da eliminação de Kemp [62] em 1973 (Fig. 09), esta reação tem sido utilizada como modelo para transferência de próton de carbono [63]. A reação é sensível ao ambiente reacional e concentração local de íons hidróxido, a diferença nas velocidades de reação entre solventes apróticos e próticos está na ordem de 10^8 [39, 62, 63].

Recentemente, Engberts e colaboradores [39, 63, 64] empregaram esta reação a fim de mimetizar enzimas a partir de agregados formados por surfactantes, micelas e vesículas. Tanto micelas quanto vesículas catalisaram eficientemente a reação (Fig. 09), porém vesículas se mostraram mais eficientes do que micelas, provavelmente por oferecer microambientes menos polares nos sítios de ligação para a desprotonação do substrato [63].

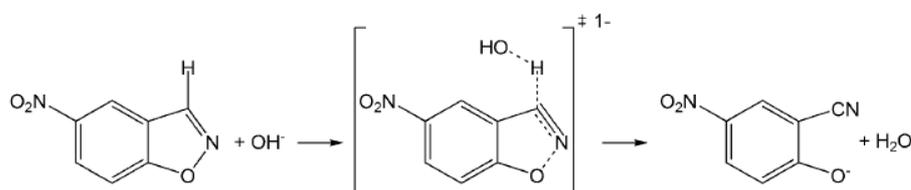


Figura 09: Reação de desprotonação do 5-nitrobenzoxazol (eliminação de Kemp).

Além do interesse em mimetizar enzimas, reações modelo podem ser utilizadas como sondas cinéticas na caracterização de interação polímero-surfactante. Zanette e colaboradores [65, 66] utilizaram a hidrólise ácida de acetais como técnica suplementar para caracterizar a formação ou ausência da formação de agregados polímero-surfactante, obtendo perfis de k_{obs} vs. concentração de surfactante pode-se observar claramente descontinuidades relacionadas com a *cmc*, *cac* e *psp* dos sistemas estudados.

1.8. Definições das Técnicas

1.8.1. Condutividade Elétrica e Concentração Micelar Crítica (*cmc*)

A condutividade elétrica é a medida da mobilidade das espécies iônicas em solução. A condutividade elétrica de uma solução é dependente da concentração, do tipo de íon e do eletrólito presente. No caso de eletrólitos fortes, a variação na condutividade elétrica da solução é diretamente proporcional à concentração de eletrólito adicionado. Já para eletrólitos fracos, como a concentração de íons é dependente do equilíbrio de dissociação, a condutividade dependerá do grau de ionização (α) do eletrólito. A unidade de condutividade é $S\ cm^{-1}$.

A Figura 10 mostra um gráfico típico da condutividade específica vs. concentração molar de um surfactante aniônico. A *cmc* é definida na concentração de surfactante na qual ocorre uma brusca mudança no perfil de condutividade elétrica. Abaixo da *cmc*, ocorre um aumento linear da condutividade, que é característico de eletrólitos fortes e a inclinação depende da condutividade molar das espécies em solução, isto é, do contra-íon e da cadeia carbônica. Após a micelização, cada monômero adicionado contribui para a formação de micelas. As micelas iônicas não são totalmente ionizadas, mas apenas uma fração α de íons fica livre em solução, comportamento este que é esperado para eletrólitos fracos. Como nem todos os contra-íons estão livres em solução, o resultado esperado é o aparecimento de uma descontinuidade no perfil. Esta mudança de propriedade é observada em uma titulação condutimétrica. Portanto, acima da *cmc*, o incremento da condutividade da solução com a adição de surfactante é menor.

Assim, dentro de uma aproximação, a partir do gráfico da Figura 10, a razão entre a inclinação da região linear acima (S_3) e abaixo (S_1) da *cmc* é uma medida do grau de ionização (α) de micelas iônicas. O conhecimento do parâmetro α é relevante porque está relacionado com o conteúdo dos contra-íons ligados na superfície da micela e com a densidade de carga, portanto, das propriedades físico-químicas da interface micelar.

O ponto de encontro das duas regiões lineares do perfil de condutividade específica vs. concentração de surfactante, experimentalmente corresponde a *cmc* (Fig. 10) [27].

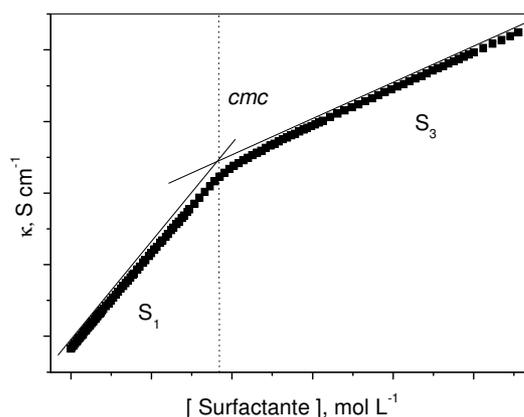


Figura 10: Perfil de condutividade elétrica vs. [surfactante].

1.8.2. Fluorescência do Pireno

Quando um átomo ou molécula absorve energia, elétrons passam para um estado excitado de energia. Há várias maneiras de retornar ao estado fundamental e uma delas é via

fluorescência. A fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual a espécie é excitada por absorção eletromagnética num determinado comprimento de onda e, em seguida, emite radiação num comprimento de onda maior do que na absorção [67].

A fluorescência molecular é medida excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção, também conhecida como comprimento de onda de excitação, e medindo-se a emissão a um comprimento de onda mais alto denominado comprimento de onda de fluorescência. Geralmente, a emissão fluorescente é medida em ângulo reto em relação ao feixe incidente para evitar a interferência deste feixe. A emissão de curta duração é chamada fluorescência enquanto que, a luminescência de maior duração, é denominada fosforescência [67].

Como os surfactantes, na grande maioria, não são fluorescentes, utilizam-se sondas fluorescentes para acompanhar mudanças estruturais de agregados micelares. A sonda, neste caso, deve conter algumas características, como alta solubilidade no meio micelar, sensibilidade à polaridade e alta intensidade de fluorescência em baixas concentrações [68].

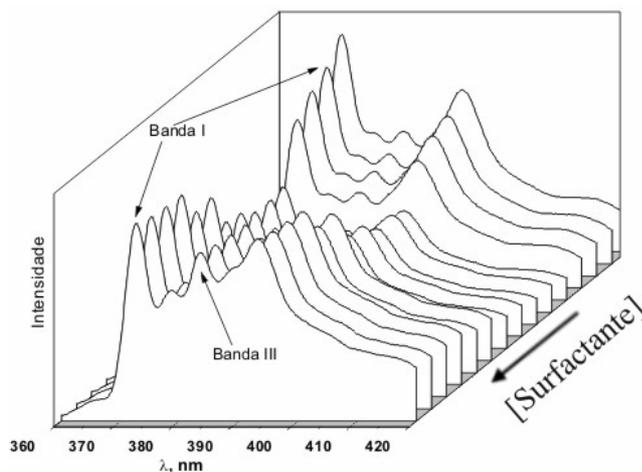


Figura 11: Variação do espectro de fluorescência do pireno com a [surfactante].

Com a utilização de sondas adequadas, a emissão de fluorescência pode dar informações importantes sobre o sistema micelar, tais como *cmc* e micropolaridade. O pireno é uma das sondas mais utilizadas. Esta molécula apresenta, na banda de emissão, cinco picos entre 370 e 395 nm (Fig. 11). A razão das intensidades entre o primeiro e o terceiro pico (I_1/I_3), é sensível às mudanças de polaridade do meio [68]. Deste modo, esta propriedade pode ser utilizada para avaliar a micropolaridade de microambientes de agregados micelares. Valores extremos desta escala de polaridade compreendem 1,84 para a água e de 0,6 para o hexano. Conforme o surfactante, a razão I_1/I_3 varia entre 0,8 e 1,4.

O valor da *cmc* é, geralmente, obtido através de mudanças na intensidade de fluorescência a um dado comprimento de onda ou a partir do gráfico I_1/I_3 vs. [surfactante]. A Figura 12 mostra um perfil típico, a *cmc* é atribuída à concentração onde a razão I_1/I_3 começa a diminuir bruscamente.

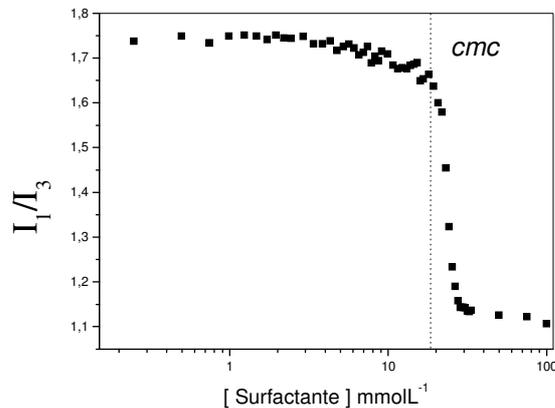


Figura 12: Exemplo de um perfil I_1/I_3 vs. concentração de surfactante.

1.8.3 Viscosidade

Usualmente define-se reologia como a ciência da deformação e fluxo da matéria. Especificamente, está preocupada com a descrição de propriedades mecânicas sob várias condições de deformação [69].

A fricção interna de fluido, causada por atração molecular, que o faz resistir a tendência de fluir é denominada viscosidade (η). Esta é uma grandeza física frequentemente associada às propriedades dinâmicas dos fluidos, nos quais se incluem gases, vapores, líquidos, material plásticos, ou mesmos grãos de matéria sólida. A viscosidade pode variar em função de vários parâmetros, como pressão, temperatura, velocidade de escoamento e mesmo o tempo. Independente de sua constituição, a viscosidade dos diferentes materiais fluidos é usada como importante parâmetro que os caracterizam molecularmente, e assim é de interesse tanto em ambientes científicos como tecnológicos.

Soluções diluídas de surfactantes geralmente comportam-se como líquidos Newtonianos, assim a viscosidade de suas soluções podem ser utilizadas para obter-se informações sobre seu tamanho, forma e hidratação das micelas [69-72]. Em sistemas mais concentrados, as “partículas micelares” interagem umas com as outras e as soluções passam a ter comportamento visco-elástico.

Em um viscosímetro capilar, a viscosidade do líquido é proporcional à sua densidade e ao tempo de escoamento:

$$\eta = k\rho t \quad \text{Equação 08}$$

Onde k é uma constante do viscosímetro, ρ a densidade do líquido e t o tempo de escoamento. Como a constante do viscosímetro é algo difícil de determinar, pois leva em conta parâmetros como o diâmetro do capilar, mede-se a viscosidade relativa (η_{rel}):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s} = \frac{k\rho t}{k\rho_o t_o} \quad \text{Equação 09}$$

Deste modo não é necessário conhecer a constante do viscosímetro. Para uma solução diluída $\rho_o = \rho$, a viscosidade relativa passa a ser simplesmente a razão entre os tempos de escoamento da solução (t) e do solvente puro (t_o). Pode-se a partir da viscosidade relativa determinar a viscosidade reduzida (Eq. 010), que é interpretada como a contribuição na viscosidade por monômero de surfactante ou por mol de moléculas.

$$\eta_{red} = \left(\frac{\eta_{rel} - 1}{c} \right) \quad \text{Equação 10}$$

Nesta técnica, o modo como o valor de cmc é atribuído depende essencialmente do tratamento realizado nos dados experimentais, na viscosidade relativa é determinada no ponto onde esta começa a aumentar fortemente (fig. 13 A), enquanto que na viscosidade reduzida é obtida por um mínimo (fig. 13 B.).

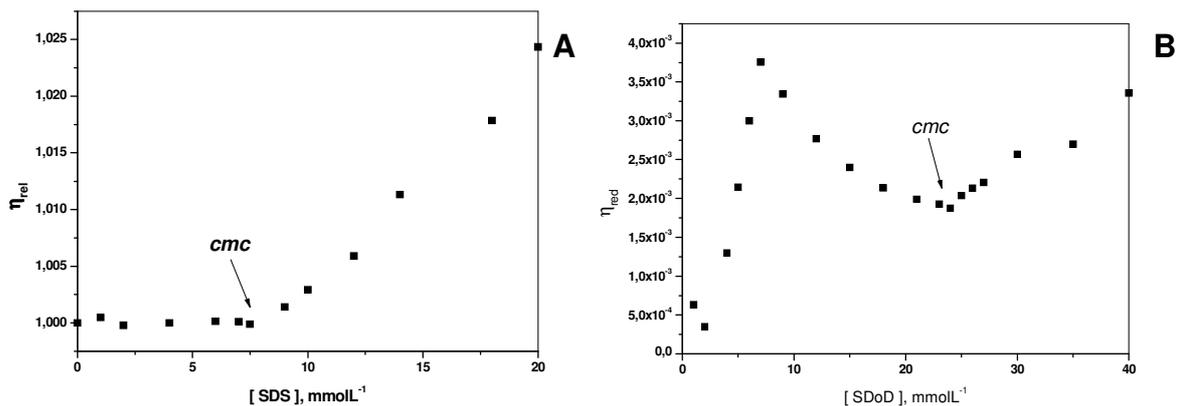


Figura 13: A – Exemplo de um perfil de η_{rel} vs. [surfactante]. B – Exemplo de perfil um de η_{red} vs. [surfactante] com formação de micelas esféricas.

RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

A crescente demanda pelo melhoramento das propriedades de surfactantes pela adição de polímeros tem gerado grande interesse tanto na área acadêmica quanto na indústria. Apesar de esses sistemas terem sido bastante explorados, existe ainda muita discussão e controvérsia quanto aos mecanismos e força motriz da associação entre polímeros e surfactantes.

A utilização de misturas de surfactantes é largamente empregada e investigada por conduzirem a desempenhos normalmente superiores àqueles apresentados por um único surfactante. Em aplicações práticas, sempre se usa uma mistura, devido a efeitos sinérgicos de propriedades físico-químicas, ou por causa da dificuldade e custo de sintetizá-los isomericamente puros.

Sais de bÍlis são surfactantes de ocorrência natural, portanto biossurfactantes. *In vivo* são responsáveis pela solubilização e transporte de lipÍdeos e gorduras. Devido a sua particular estrutura e rigidez estrutural, apresentam características bem diferentes dos surfactantes clássicos em solução aquosa. Vários estudos foram realizados na busca do entendimento de sua morfologia e determinação de parâmetros físico-químicos [14, 17]. A utilização de misturas de surfactantes clássicos e sais biliares têm atraído grande interesse, pois simulam processos biológicos. Alguns trabalhos utilizam a influência de macromoléculas [73, 74].

Este trabalho tem por objetivo investigar a associação do sal biliar colato de sódio (NaC) com o polÍmero neutro hidrossolúvel poli(oxietileno) PEO, induzido por dodecanoato de sódio (SDoD), um surfactante clássico de ocorrência natural e portanto um biossurfactante também. Com a utilização de técnicas como fluorescência do pireno, condutividade elétrica e viscosidade pretende-se monitorar parâmetros como *cmc*, *cac*, e *psp* de misturas de SDoD e NaC na ausência e em presença de PEO, em meio tamponado levemente básico com o tampão Tris/HCl, 20mmol L⁻¹, em pH 9,00, para evitar formação de espécies protonadas em regiões próximas ao *pka* do ácido cólico ($\approx 6,5$) a temperatura de 25,0 °C.

Em um segundo momento de posse dos dados acima citados pretende-se estudar a hidrólise do acetato de p-nitrofenila (PNPA) e a eliminação de Kemp com o substrato 5-nitrobenzisoaxazol (5-NBI) como sondas cinéticas para acompanhar a formação de agregados micelares SDoD-NaC, na ausência e em presença de PEO, em diferentes frações molares. A primeira reação é largamente encontrada na literatura [41, 54, 55], especialmente em meio

micelar, tornando-a um modelo de fácil comparação, no entanto pouco se estudou este tipo de reação com sais biliares na presença de outros tipos de surfactantes e especialmente de polímeros. Além disso, sabe-se que sais biliares participam da hidrólise dos acetatos de tocoferil e retinil precursores *in vivo* da vitamina E e A, respectivamente, através da ativação de lipases, tornando a reação de hidrólise de ésteres um modelo interessante para este estudo [75]. A segunda reação, eliminação de Kemp, é uma reação bimolecular de desprotonação catalisada por base e tem sido muito utilizada para caracterizar efeitos do meio, especialmente por ser altamente sensível ao microambiente reacional [39, 76], tornando-a interessante para este estudo.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e Métodos

O colato de sódio (99%), procedente da Sigma, foi utilizado sem nenhum tratamento prévio, assim como o poli(oxietileno). O dodecanoato de sódio foi preparado por neutralização do ácido dodecanóico (Sigma 99%), conforme o seguinte procedimento: a uma quantidade do ácido carboxílico dissolvido num volume mínimo de etanol, sob agitação, adicionava-se solução diluída de hidróxido de sódio mantendo a solução resultante ligeiramente aquecida. A neutralização era controlada por meio de um pHmetro da Beckman modelo $\Phi 71$, equipado com um eletrodo combinado de vidro. A titulação foi conduzida até pH 9,00. Resfriando-se a mistura, o dodecanoato de sódio formava um precipitado pastoso que era filtrado e recristalizado [77].

As purezas do colato de sódio e do dodecanoato de sódio foram testadas por tensão superficial utilizando, como critério, [2] a obtenção de um gráfico de tensão superficial vs. logaritmo da concentração molar do surfactante, sem mínimo na região de concentração de surfactante onde ocorre a *cmc*. Nas condições experimentais estudadas, os valores de *cmc* são 25,0 mmol L⁻¹ e 10,0 mmol L⁻¹ para o SDoD e o NaC, respectivamente.

Os parâmetros de micelização das misturas de NaC e SDoD foram determinados na ausência e em presença de 0,050 mol L⁻¹ de PEO, em condições de 0,020 mol L⁻¹ de tampão tris/HCl, pH 9,00, a 25,0 ± 0,1°C.

Todos os experimentos foram realizados em solução tampão, pH 9,00, de tris(hidroximetil)aminometano (Tris/HCl) (Aldrich 99%). As soluções estoques de 20 mmol L⁻¹ de Tris/HCl foram preparadas titulando a solução de Tris com solução padrão de HCl, a 25°C, acompanhando a variação do pH com o pHmetro da Beckman.

As soluções estoques dos surfactantes foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas na mesma solução tampão. A água utilizada para todos os experimentos foi previamente destilada e desmineralizada pelo sistema de purificação de água Milipore (Mili-Q).

As soluções-estoque do polímero foram preparadas dissolvendo-o com solução tampão tris/HCl, sob agitação suave, no mínimo, durante 12 horas. Será considerada a massa molecular do monômero do polímero nos cálculos da molaridade. Esta solução será usada para preparar aquelas contendo SDoD e NaC.

O acetato de p-nitrofenila (99%) procedente da Sigma foi utilizado sem tratamento prévio, e sua pureza foi aferida através do seu ponto de fusão (74-76 °C). O 5-nitrobenzisoxazol foi sintetizado no laboratório de acordo com o método descrito por Stokker [78] e caracterizado pelo seu ponto de fusão e RMN H^1 , obtendo-se 125-127°C como temperatura de fusão, considerada satisfatório comparado ao valor da literatura (126°C) [78]. O espectro de RMN H^1 é apresentado na figura 14.

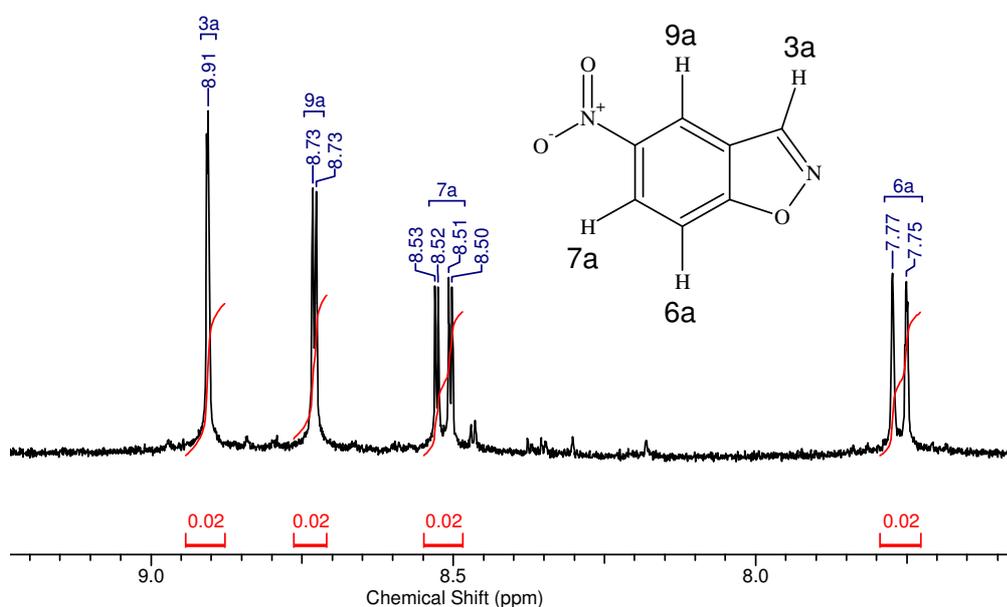


Figura 14: Espectro de RMN H^1 do 5-nitrobenzisoxazol.

2.1.1. Medidas de pH

As medidas de pH foram feitas utilizando um pHmetro Beckman modelo ϕ 71, equipado com um eletrodo de vidro combinado.

2.1.2. Método Condutimétrico

As medidas de condutividade específica em função da concentração de surfactante, com ou sem PEO, foram assim executadas: pequenos volumes de solução-estoque de SDoD

ou NaC, inicialmente eram adicionados através de uma bureta, sobre um volume conhecido de solução tampão contido numa cela de diluição, previamente termostatizada a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Com o eletrodo de condutividade (constante da cela igual a 1,0) mergulhado na solução, fazia-se a leitura da condutividade específica a cada adição da solução estoque. O cálculo da concentração resultante, após cada adição, era corrigido considerando o volume total da solução contido na cela.. O sistema de titulação consistia de condutivímetro modelo 170 ATI ORION, equipado com eletrodo de platina e, para a adição da solução estoque do surfactante, de uma bureta semi-automática da Metrohm Herisau tipo Multi-Bürette, modelo E-485, com capacidade para 20 mL.

2.1.3. Viscosidade

As medidas de tempo de escoamento de soluções contendo surfactante, com e sem polímero, foram obtidas utilizando um viscosímetro capilar Cannon-Fenske da SCHOTT, número 75, contido num banho termostatizado, a 25°C . O tempo de escoamento era estimado por um medidor AVS - 170 da SCHOTT. As amostras eram, rotineiramente, preparadas diluindo-se a solução estoque para concentrações em volumes de 10 mL e deixadas em repouso, no mínimo, durante duas horas antes de serem usadas. Os resultados foram expressos em gráficos de viscosidade relativa (η_{rel}) versus concentração de surfactante

2.1.4. Método Fluorimétrico

As medidas de fluorescência do estado estacionário do pireno (Aldrich, 99%) foram realizadas em soluções tamponadas com 20 mmol L^{-1} de Tris/HCl. A solução estoque de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de pireno foi preparada em etanol absoluto. A partir da solução estoque, foi preparada em tampão uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ adicionando-se 1 mL de solução estoque para cada litro de solução tampão. As soluções com 50 mmol L^{-1} de PEO foram preparadas na solução tampão Tris/HCl já contendo o pireno, deixando-se o polímero sob agitação magnética durante 12 horas. Então as soluções estoque de SDoD e NaC e misturas de ambos foram preparadas com a solução tampão já contendo o pireno e o PEO. Os espectros foram registrados após 6 horas da preparação das soluções minimizando assim possíveis erros na intensidade da emissão que ocorre em metodologias alternativas.

O espectro de fluorescência do estado estacionário do pireno foi obtido em um espectrofluorímetro Hitachi F4500 equipado com uma cela termostatizada, a 25°C , e a

amostra agitada em uma cela de quartzo com 10 mm de caminho óptico. Ambas as fendas, de excitação e emissão foram ajustados em 2,5 nm. A excitação das amostras foi realizada em 336 nm e as emissões foram registradas entre 360 a 500 nm. A razão I_1/I_3 foi estimada pela razão da intensidade dos picos em 372,8 nm (I_1) e 384,0 (I_3).

2.1.5. Estudos Cinéticos

Todas as reações foram acompanhadas pela formação do produto a 400nm (PNPA) ou 380nm (5-NBI) em um espectrofotômetro Spectra Max Plus 384 da Molecular Devices (Fig.15A) com capacidade para 96 leituras simultâneas (Fig. 16 A), a 25,0°C e pH 9,00. As constantes de velocidade observada de primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas com o uso do software KaleidaGraph 3.0, pelo método da regressão não linear (Fig. 16 B), após confirmação da ordem de reação pelo método de regressão linear (Fig. 16C).



Figura 15: A – Espectrofotômetro Spectra Max Plus 384 da Molecular Devices. B – Microplaca de 2mL. C – Microplaca de 300µL.

As soluções estoques dos substratos foram preparadas em concentração adequada (PNPA $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e 5-NBI $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$) em acetonitrila (Aldrich, 99,8%) padrão de pureza espectroscópica. As soluções estoques de surfactantes, na ausência e em presença de polímero, foram preparadas diluindo-se quantidades apropriadas de solução estoque de surfactante em uma microplaca preparatória de 2mL (Fig. 15 B). Para aquisição das cinéticas transferia-se 200µL de solução de surfactante para uma microplaca de 300µL (Fig. 15 C) e realizado um branco, após adicionava-se 15µL da solução estoque contendo o substrato e iniciava-se a aquisição dos dados.

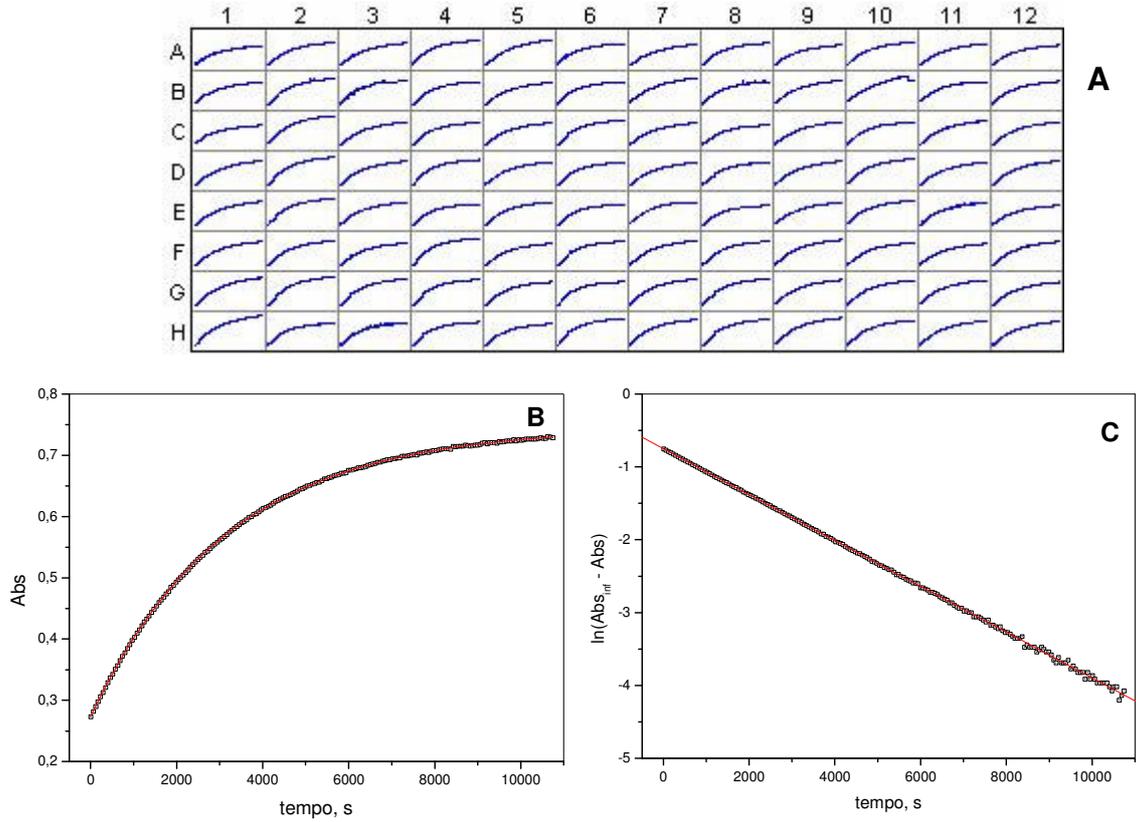


Figura 16: A – Leitura da absorbância nos 96 poços individuais. B – Regressão não-linear para uma das cinéticas da Fig. 16 A. C – Regressão linear da cinética da Fig. 16 B, comprovando a ordem da reação.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados e discussão sobre os sistemas SDoD-NaC e SDoD-NaC-PEO, estando este capítulo subdividido por técnicas utilizadas no trabalho. Os parâmetros *cmc*, *cac* e *psp* foram determinados via condutividade elétrica, viscosidade relativa, e via fluorescência do pireno (apenas a *cmc* e *cac*). As cinéticas de reação do PNPA e 5-NBI foram utilizadas como técnicas auxiliares na caracterização dos diferentes agregados micelares formados.

Neste trabalho define-se como *cac* as descontinuidades nos perfis de propriedade medida *vs.* [surfactante] em presença de PEO quando há diferença significativa entre os perfis em presença e na ausência de PEO, caso os perfis sejam idênticos considera-se a inexistência de interação polímero-surfatante e, portanto, a inexistência de *cac*.

3.1. Condutividade Elétrica

3.1.1. Medidas na ausência de PEO

Micelas iônicas são agregados que podem ligar ânions e/ou cátions de tal forma que, na *cmc*, o conteúdo iônico da solução varia com a formação delas e, o gráfico de condutividade elétrica *vs.* concentração do surfactante, na *cmc*, mostra descontinuidade. Uma informação adicional obtida dos gráficos de condutividade, refere-se aos coeficientes angulares das regiões lineares do gráfico que, abaixo e acima da *cmc*, estão relacionados com o conteúdo iônico da solução. Numa aproximação, a razão entre os coeficientes angulares está relacionada com o grau de ionização micelar [79].

A Figura 17 A mostra um perfil típico de condutividade elétrica *vs.* concentração de dodecanoato de sódio (SDoD) em tampão Tris/HCl (pH 9,00), a 25,0 °C. Observa-se no perfil uma quebra brusca em 25,0 mmol L⁻¹, correspondente a *cmc* do SDoD. Abaixo da *cmc*, no entanto, aparece uma pequena inflexão no perfil evidenciado pela diferença entre os coeficientes angulares acima e abaixo de $\cong 5,0$ mmol L⁻¹ (Fig. 17 B). Este comportamento é

devido a capacidade do SDoD em formar pré-agregados antes da *cmc*. Este comportamento foi identificado em reações de catálise micelar. Marconi e colaboradores[54] estudaram o efeito da concentração de SDoD nas reações de hidrólise do acetato de 2,4-dinitrofenil e do anidrido benzóico, observaram que em valores de pH 8,96-9,18, próximos ao utilizado neste trabalho, a velocidade da reação sofre uma pequena inibição abaixo da *cmc*, havendo em seguida incremento na velocidade com a formação de micelas, concluindo que a inibição observada abaixo da *cmc* devia-se a interação do substrato com pré-micelas ou pré-agregados de SDoD.

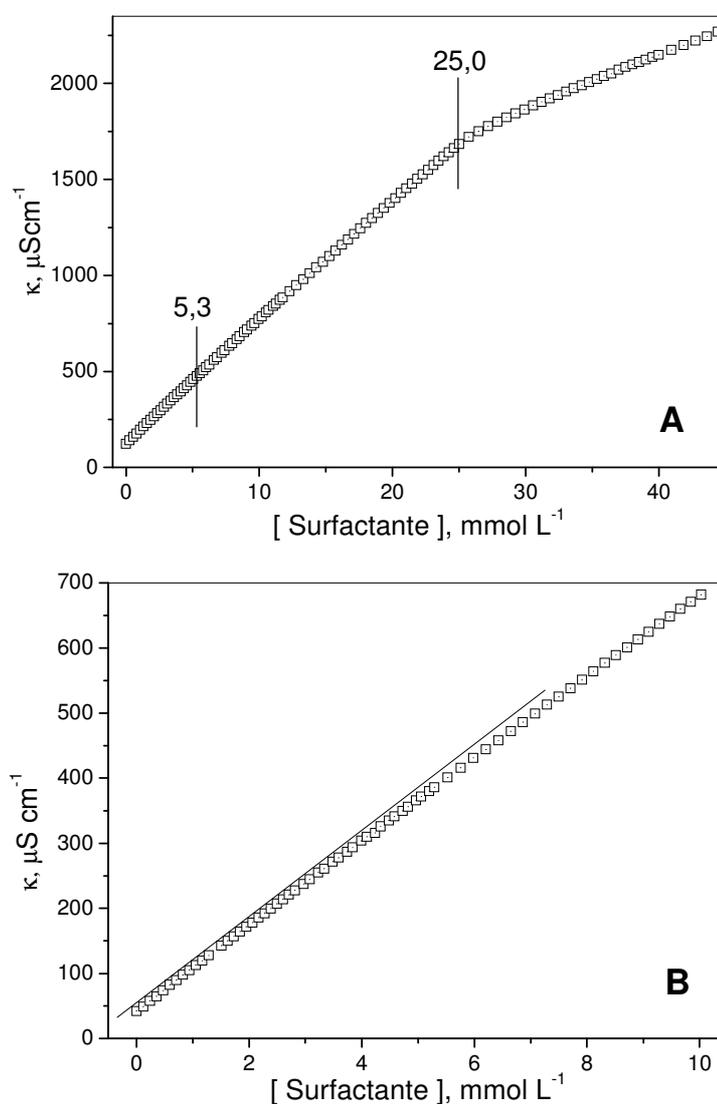


Figura 17: A – Gráfico de condutividade específica vs. [SDoD]. B – Gráfico de condutividade específica vs. [SDoD] na região abaixo de 10 mmol L^{-1} .

A Figura 18 A mostra um perfil típico de condutividade específica vs. concentração de colato de sódio (NaC). Nota-se, ao contrário do que acontece com o SDoD, a ausência de

uma quebra brusca no perfil que indique a *cmc*, porém há uma leve diferença na inclinação em $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 18 B) indicada como concentração de formação da espécie dimérica do NaC [22, 74]. Próximo deste ponto de descontinuidade, Oakenfull e Fisher [19] observaram desvios dos perfis de condutividade molar com a equação de Onsager e atribuíram à formação de dímeros.

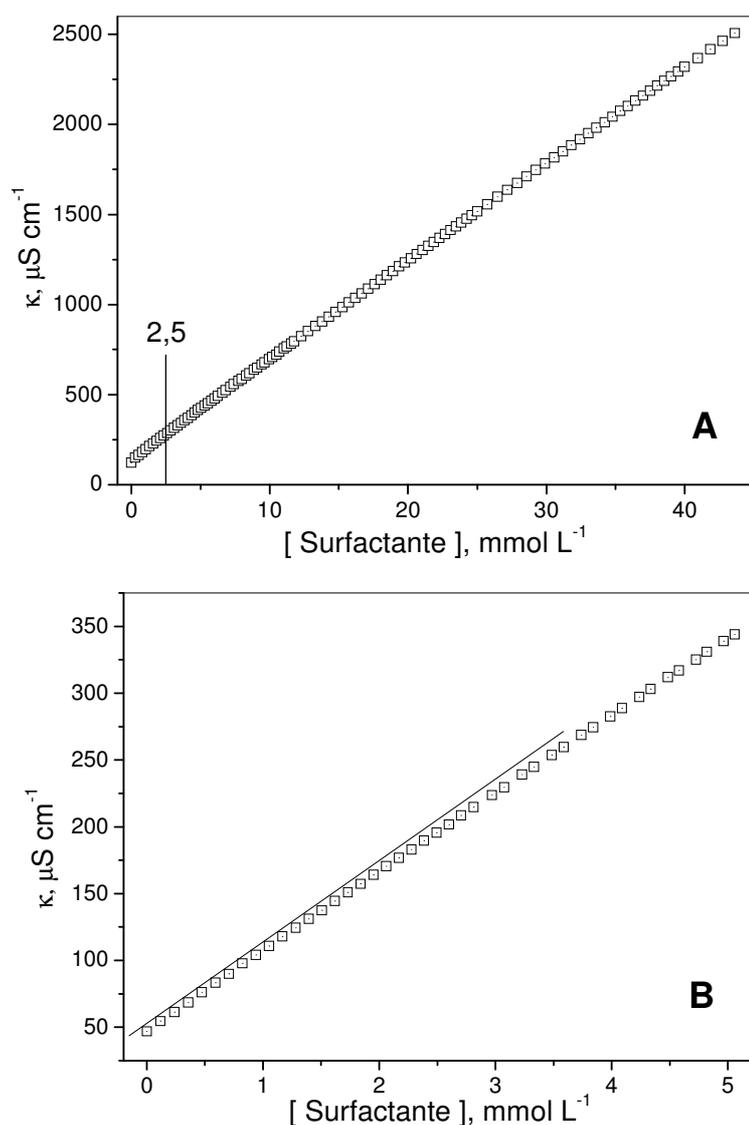


Figura 18: A – Gráfico de condutividade específica vs. $[\text{NaC}]$. B – Gráfico de condutividade específica vs. $[\text{NaC}]$ na região abaixo de 10 mmol L^{-1} .

Com a adição de SDoD à solução contendo NaC, os perfis voltam a apresentar descontinuidades, conforme observado nas Figs. 10 e 17A. No entanto, os perfis de condutividade elétrica não apresentam uma *cmc* definida e a linearização do perfil ocorre somente em concentrações bem acima da *cmc* (Fig. 19 A).

Para evitar possíveis erros na determinação dos valores de *cmc* das misturas, optou-se pela utilização de gráficos de condutividade equivalente vs. raiz quadrada de [surfactante] (Fig. 19 B). Através deste tipo de gráfico, é possível determinar com maior precisão a *cmc* para todas as frações molares em que foram realizados os experimentos. Sendo assim, a Tabela 02 mostra a variação da *cmc* da mistura SDoD-NaC em função da fração molar da mistura.

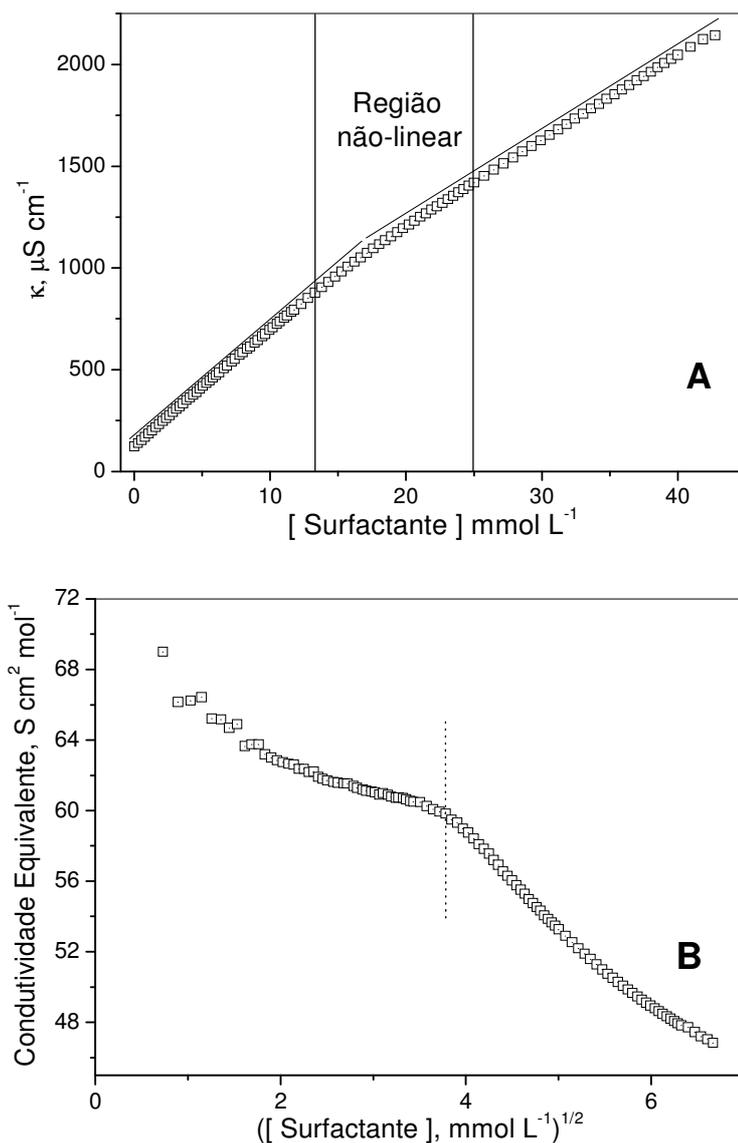


Figura 19: A – Perfil de condutividade específica vs. [surfactante] da fração 0,6 de SDoD. B – Perfil de condutividade equivalente vs. raiz quadrada da [surfactante] da fração molar 0,6 de SDoD.

Apesar dos perfis de condutividade específica não serem os mais adequados para a determinação da *cmc*, estes ainda são bastante úteis no estudo das misturas SDoD–NaC. A partir destes perfis, pode-se obter os valores dos coeficientes angulares das regiões lineares e,

portanto, estimar o grau de ionização micelar (α) mediante a razão dos coeficientes angulares (Tabela 02) que, embora em outras condições experimentais, são semelhantes àqueles obtidos por Zanette e Frescura [80]. Para o NaC, o valor de $\alpha \approx 1$ representa uma estrutura micelar que não têm a capacidade de ligar contra-íons. Para as misturas os valores de α são intermediários aos valores para os surfactantes puros, denotando a formação de diferentes agregados micelares, que dependem essencialmente da fração molar de surfactante.

Assim, como para os surfactantes puros, em misturas deles também foram observadas pequenas discontinuidades em concentrações entre 2,5 e 5,0 mmol L⁻¹ (Tabela 02). Para definir a formação de pré-agregados com mais precisão, foram realizadas medidas de condutividade elétrica em concentrações diluídas. Os valores de *cpa* estão listados na Tabela 02. A formação e composição destes pré-agregados estão relacionadas com a fração molar e concentração total de surfactante.

Tabela 02: Valores de concentração micelar crítica (cmc), concentração de pré-agregação (cpa), e dos coeficientes angulares obtidos a partir de gráficos de condutividade elétrica, para diferentes misturas de SDoD-NaC.

χ_{SDoD}	<i>cmc</i> mmol L ⁻¹	<i>cpa</i> mmol L ⁻¹	S ₁₁ [*]	S ₁₂ [*]	S ₃ [*]	α
1,0	25,0	5,1	66,6	63,2	27,4	0,41
0,9	18,0		66,6	62,0	31,9	0,48
0,8	15,6	4,4	65,2	63,2	33,5	0,51
0,7	14,7		65,5	61,1	35,1	0,54
0,6	14,3	3,5	63,7	59,7	38,3	0,60
0,5	13,9		59,1	56,0	41,2	0,70
0,4	13,8	3,2	58,8	56,8	44,3	0,75
0,3	13,3		59,1	55,6	46,0	0,79
0,2	12,4	3,0	60,0	57,7	52,7	0,88
0	10,0 ^{**}	2,6	59,5	55,8	53	0,89

* Os coeficientes angulares S₁₁ e S₁₂ referem-se às inclinações acima e abaixo da concentração de pré-agregação (*cpa*) e S₃ refere-se ao coeficiente angular acima da *cmc*.

** Valor *cmc* com base em formação de micelas primárias e obtido via fluorescência do pireno e viscosidade.

3.1.2. Medidas em presença de PEO

A Figura 20 mostra um perfil típico de condutividade específica vs. [SDoD] em presença de 50 mmol L⁻¹ de PEO. Em concentrações menores do que a *cac*, o perfil apresenta

as mesmas características daquele na ausência de PEO (Fig. 17), inclusive quanto à pré-agregação que parece não ser afetada pela presença do polímero. Nota-se no perfil uma forte mudança em torno de $20,6 \text{ mmol L}^{-1}$, que indica o início do processo de associação cooperativa entre surfactante e o polímero, conhecida como a concentração de agregação crítica, *cac*. Entre $20,6$ e $41,6 \text{ mmol L}^{-1}$, há uma região definida como a etapa em que ocorre a formação dos agregados SDoD-PEO. Acima do ponto de saturação do polímero, *psp*, ($41,6 \text{ mmol L}^{-1}$), começam a surgir micelas livres em solução, e o perfil passa a se comportar de maneira igual ao na ausência de polímero, isto é evidenciado pelo coeficiente angular S_3 , que é o mesmo em presença ($28,0$) e na ausência de PEO (Tab. 02).

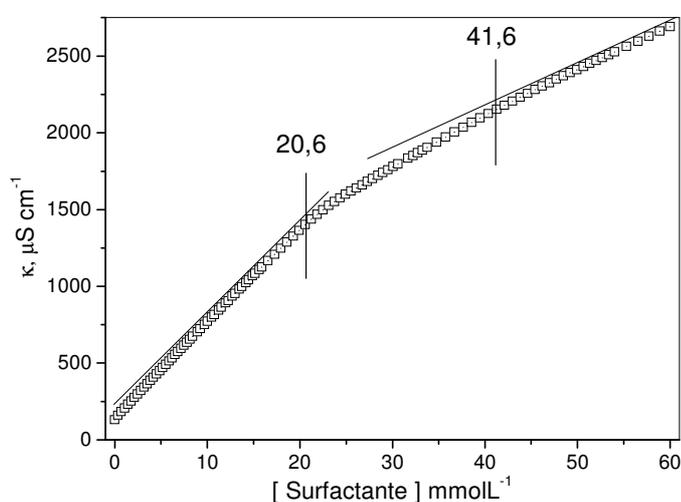


Figura 20: Gráfico de condutividade específica vs. [SDoD] em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO.

A Figura 21 contém um gráfico de condutividade específica vs. [NaC] em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO. Comparando-se os gráficos de condutividade específica vs. [NaC] em presença e na ausência de PEO (Fig. 18), não se observa diferenças significativas entre os perfis. Estes resultados são compatíveis com resultados já obtidos no nosso laboratório de que NaC e PEO não se associam cooperativamente [6].

Assim como na ausência de PEO, em presença observou-se, acima da *cmc*, uma faixa de concentração não-linear. Deste modo utilizou-se novamente perfis de condutividade equivalente vs. raiz quadrada da concentração para determinar a *cmc* das misturas SDoD-NaC. A Figura 22 mostra diferentes perfis de condutividade equivalente vs. raiz quadrada da concentração total de surfactante em diferentes frações molares de SDoD-NaC.

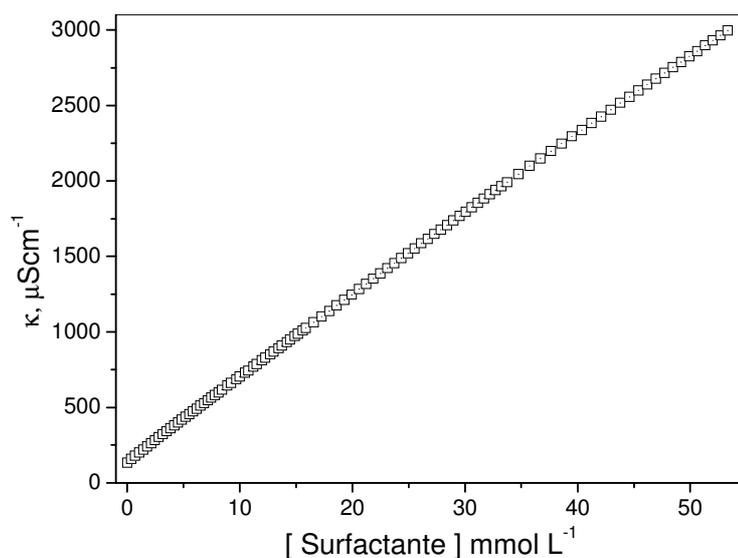


Figura 21: Gráfico de condutividade específica vs. $[NaC]$ em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO.

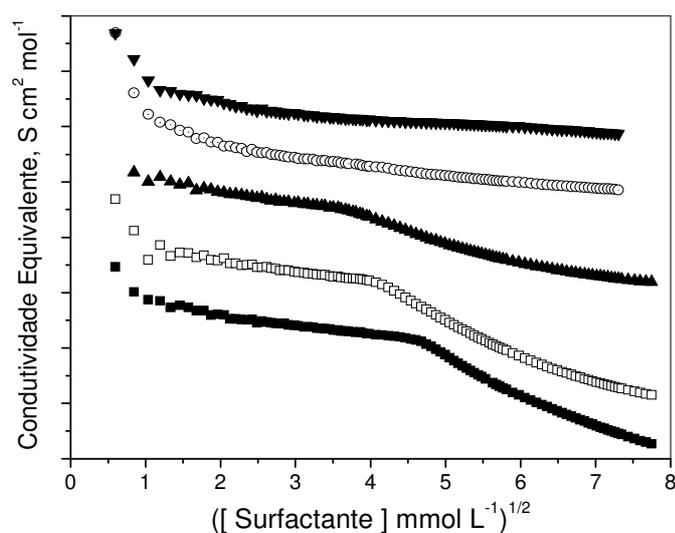


Figura 22: Perfis de condutividade equivalente vs. raiz quadrada $[surfactante]$ para diferentes frações molares de SDoD–NaC em presença de PEO: (■) 1,0 de SDoD; (□) 0,8 de SDoD; (▲) 0,5 de SDoD; (○) 0,2 de SDoD; (▼) 0 de SDoD.

A partir de perfis como os da Fig. 21, foram determinados os valores de cmc e da cac para diferentes frações molares da mistura SDoD–NaC, em várias concentrações de PEO (Fig. 23). Observou-se que a cac do SDoD não sofre alterações significativas com o aumento da concentração de PEO, mantendo-se constante na faixa estudada ($\cong 21 \text{ mmol L}^{-1}$). Os resultados indicam a inexistência de associação cooperativa do SDoD e NaC com o PEO em frações molares menores do que 0,9 de SDoD, independente da concentração de polímero.

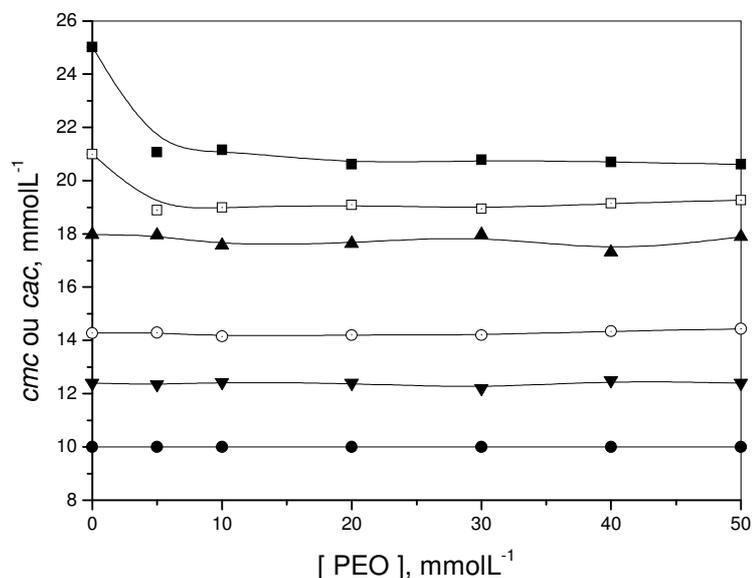


Figura 23: Variação da *cmc* ou *cac* da mistura SDoD–NaC em função da [PEO] nas seguintes frações molares: (■) 1,0 de SDoD; (□) 0,95 de SDoD; (▲) 0,9 de SDoD; (○) 0,6 de SDoD; (▼) 0,2 de SDoD; (●) 0 de SDoD.

3.2. Fluorescência do Estado Estacionário do Pireno

3.2.1. Medidas de *cmc* e *cac*

A *cmc* de surfactantes pode ser obtida também a partir do gráfico da razão das intensidades das bandas I_1 e I_3 do espectro de emissão de fluorescência do pireno (Fig. 13). A Figura 24 mostra um perfil da razão I_1/I_3 vs. [SDoD] na ausência e em presença de PEO. O perfil na ausência de PEO é típico de surfactantes clássicos, onde logo após a *cmc* os valores de I_1/I_3 caem bruscamente [81]. Usualmente, os valores de *cmc* obtidos por esta técnica são ligeiramente menores do que dos valores determinados através do método condutimétrico (Fig. 17). Essa diferença é normalmente esperada considerando que o pireno, devido a sua baixa solubilidade em água, induz formação de pré-agregados micelares [79].

Comparando-se os perfis na ausência e em presença de PEO, observa-se uma expressiva mudança devido a associação entre SDoD e PEO. Esta técnica indica que o início da associação (*cac*) ocorre em $16,6 \text{ mmol L}^{-1}$ enquanto que a *cmc* aparece em $21,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Esta técnica, no entanto, não é apropriada para determinar o *psp*.

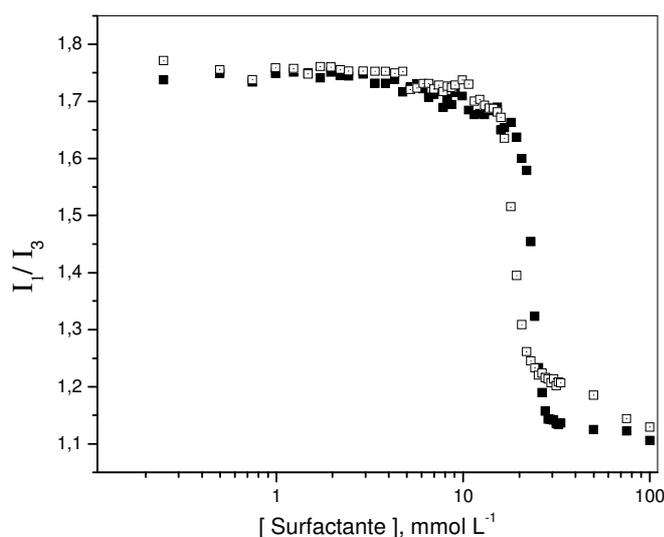


Figura 24: Razão das intensidades das bandas I_1 e I_3 do espectro de fluorescência do pireno vs. $[SDoD]$ na ausência (■) e em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO (□).

Ao contrário da técnica de condutividade elétrica (Fig. 18), onde não foi possível observar a *cmc* do colato de sódio, a técnica de fluorescência é muito clara na indicação de auto-associação. A Figura 25 mostra o perfil de I_1/I_3 vs. $[NaC]$ na ausência e em presença de PEO. Observa-se uma mudança brusca em $\cong 10 \text{ mmol L}^{-1}$ caracterizando uma *cmc*. Uma diferença relevante entre os perfis do SDoD e do NaC é a de que, ao contrário do perfil obtido para o SDoD (Fig. 24) onde acima de $29,0 \text{ mmol L}^{-1}$ I_1/I_3 é constante, para o de NaC a razão I_1/I_3 diminui progressivamente até em concentrações próximas de $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Este fato é coerente com o processo de crescimento dos agregados micelares de NaC e a transição de estruturas de micelas primárias para micelas secundárias, como já observado em diversos trabalhos [6, 14, 17-20, 22].

Enfatiza-se que, quando o surfactante usado é o NaC, assim como observado anteriormente por condutividade elétrica (Figs.18 e 21), também via fluorescência não se observou alterações no perfil de I_1/I_3 vs. $[NaC]$ com a adição de 50 mmol L^{-1} de PEO (Fig. 25), ratificando a conclusão de que micelas primárias de NaC não se associam com o polímero. Os valores de *cmc* obtidos para as misturas SDoD–NaC estão na Figura 27. Observa-se que, somente em frações molares maiores que 0,8, ocorre variação significativa da *cmc*, enquanto para frações molares menores, a *cmc* $\cong 10 \text{ mmol L}^{-1}$. Ao comparar os valores de *cmc* listados na Tabela 02 com os graficados na Figura 27, observa-se que a diferença nos valores encontrados para as duas técnicas nas frações molares acima de 0,2 de SDoD é constante ($\cong 3,0 - 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Este comportamento é explicado pela capacidade do pireno

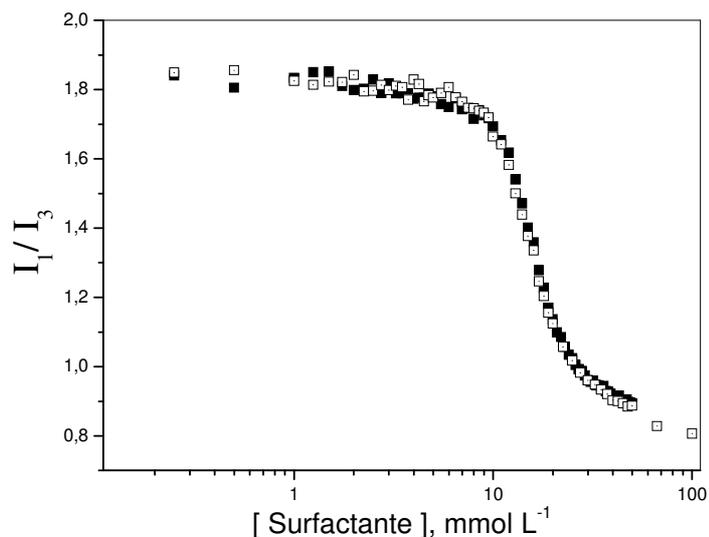


Figura 25: Razão das intensidades das bandas I_1 e I_3 do espectro de fluorescência do pireno vs. $[NaC]$ na ausência (■) e em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO (□).

em induzir a formação de micelas. Em frações molares mais baixas a diferença encontrada é menor, pois nestas frações os agregados micelares são muito próximos daqueles do NaC puro e o efeito do pireno é amenizado.

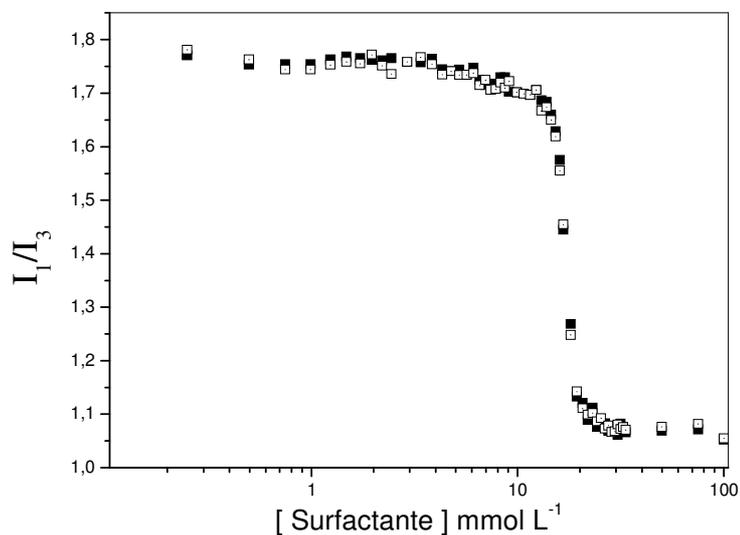


Figura 26: Razão das intensidades das bandas I_1 e I_3 do espectro de fluorescência do pireno vs. $[surfactante]$ da fração molar 0,9 de SDoD na ausência (■) e em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO (□).

Para as misturas de SDoD–NaC, o polímero induz alguma mudança no perfil de I_1/I_3 vs. $[Surfactante]$ somente em frações molares próximas de 1 (Fig. 26). A Fig. 26 mostra os perfis com e sem polímero que são idênticos em toda faixa de concentração da mistura. Estes

resultados mostram novamente a ausência do processo ligação cooperativa entre mistura de SDoD e NaC com o PEO exceto em frações molares maiores do que 0,9 de SDoD (Fig. 27).

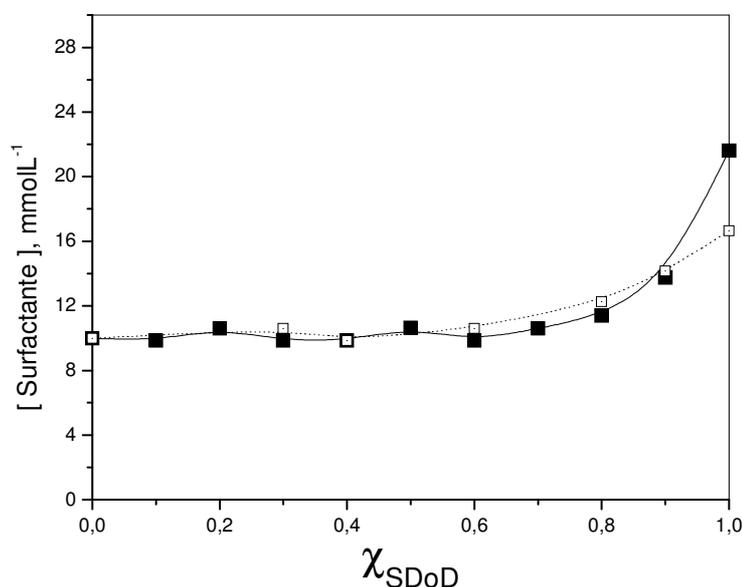


Figura 27: Valores de *cmc* e *cac* em função da fração molar de SDoD obtidas por fluorescência do pireno, na ausência (■) e em presença de 50 mmol L⁻¹ de PEO (□).

3.2.2. Micropolaridade

Recentemente, tem-se utilizado o pireno para monitorar as mudanças de polaridade em agregados micelares formados em misturas de polímero e surfactante [74]. Neste trabalho, em altas concentrações de SDoD, observou-se que a razão I_1/I_3 tende a 1,1, enquanto que, em frações altas de NaC, ela diminui para valores próximos de 0,8. Esta significativa diferença dos valores de I_1/I_3 em função da fração molar da mistura, qualitativamente, serviu como técnica para acompanhar a variação da composição do agregado misto de SDoD e NaC. A Figura 28 mostra os perfis em diferentes concentrações fixas da mistura, variando as frações molares na ausência e em presença de PEO.

Na interpretação dos resultados da Fig. 28 A, são levados em consideração dois pontos relevantes: O primeiro refere-se à *cmc* de cada fração molar da mistura sendo, neste caso, os valores de *cmc* da Tabela 02, uma referência na discussão. A premissa é de que, sempre que a razão I_1/I_3 é avaliada próximo da *cmc*, espera-se que ocorram fortes mudanças de polaridade do pireno. O segundo ponto a ser considerado refere-se ao fato de que, mesmo em NaC puro, com aumento em sua concentração, a sonda indica contínuas mudanças de polaridade. Assim, quando na ausência de SDoD, os perfis da Figura 28 A indicam que a

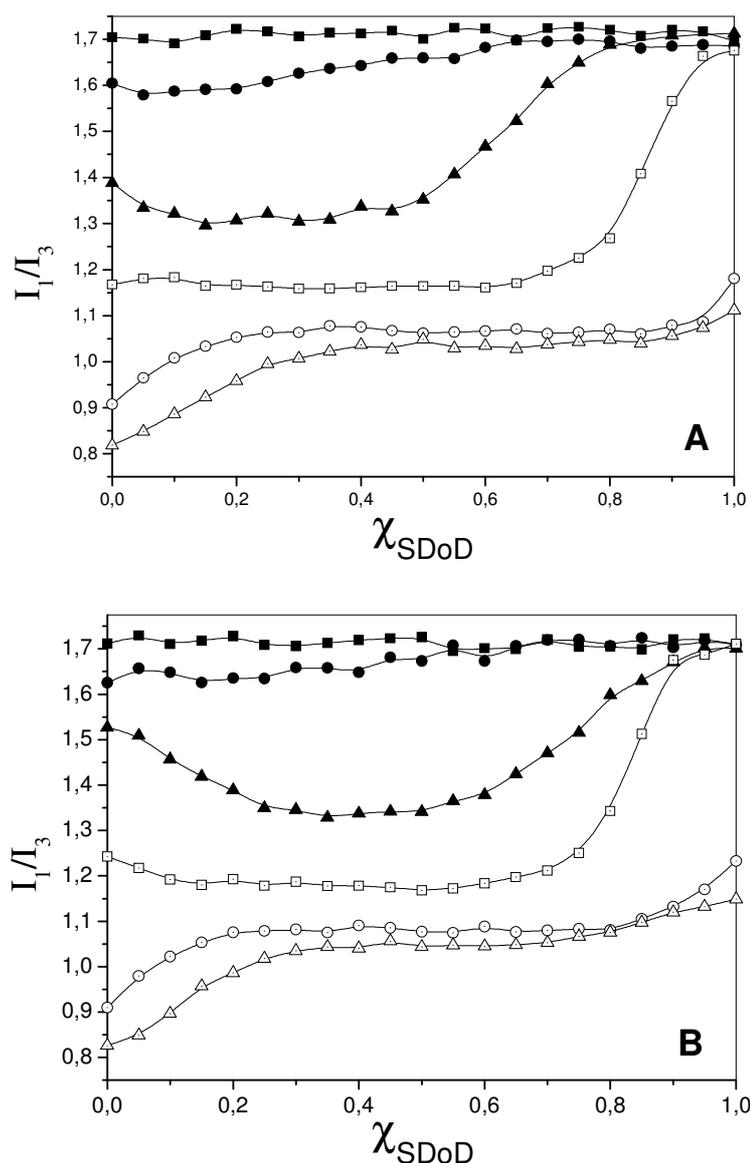


Figura 28: Perfis da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno em função da fração molar de SDoD na ausência (A) e em presença de 50mmolL^{-1} de PEO. Em (■) 7,5, em (●) 10, em (▲) 12,5, em (□) 15, em (○) 30, em (△) 80 mmol L^{-1} de surfactante.

razão decresce de 1,7, quando em água, a 0,82. Este fato deve estar relacionado com as contínuas variações estruturais das micelas de NaC que ocorrem quando sua concentração é aumentada. Recentemente, utilizando sondas derivadas do naftaleno, Bohne *et al* [82] sugeriram a concentração $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de NaC, como um limite de mudança na predominância de micelas primárias para secundárias. Assim, os resultados mostrados na Figura 28, podem ser encarados como mais uma evidência para enfatizar a conclusão de Bohne *et al* [82] considerando que, no perfil com a concentração de surfactante de $15,0\text{ mmol L}^{-1}$, o valor de I_1/I_3 indica que o pireno “sente” uma polaridade intermediária. Isto é, em

concentrações menores, a sonda indica um ambiente mais polar enquanto que, acima de 20mmolL^{-1} , a polaridade tende para valores próximos daqueles de hidrocarbonetos.

A partir dos perfis da Figura 28 A, anotam-se as seguintes considerações: (i) Nas concentrações menores do que a *cmc* ($7,5\text{ mmol L}^{-1}$) e no limite dela ($10,0\text{ mmol L}^{-1}$), os valores de I_1/I_3 são semelhantes aos valores em água ($I_1/I_3 = 1,7$). Neste caso, o pireno indica uma polaridade tipicamente da água, porque em todas as frações molares os agregados micelares estão ausentes e/ou a concentração de agregados micelares é pequena; (ii) Nas várias misturas estudadas, quando em condições de alta concentração de NaC, a polaridade gradativamente diminui com o aumento da [surfactante] porque os agregados micelares são tipicamente agregados de NaC, e comportam-se como acima comentado quando na ausência de SDoD. Salienta-se que, em $12,5\text{ mmol L}^{-1}$ da mistura, portanto menor do que a concentração limite de $20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de NaC, com o aumento da χ_{SDoD} , a razão I_1/I_3 ligeiramente diminui, atinge um platô e, a partir de $\chi_{\text{SDoD}} \approx 0,5$, aumenta até atingir valores de $I_1/I_3 = 1,7$ em altas frações de SDoD. Observa-se que, em $\chi_{\text{SDoD}} \approx 0,5$, a *cmc* da mistura é próxima de 14 mmol L^{-1} (Tab. 02) o que justifica o pireno localizado em microambientes de polaridade gradativamente alta.

Em concentrações da mistura maiores do que $20,0\text{ mmol L}^{-1}$, portanto, em 30 e 80 mmol L^{-1} , a razão I_1/I_3 aumenta e, a partir de $\chi_{\text{SDoD}} \approx 0,2$ inicia um platô que se estende até $\approx 0,8$ e, acima, os valores de I_1/I_3 são tipicamente de micelas de SDoD, $I_1/I_3 = 1,10$ em 80 mmol L^{-1} . (Lit. = 1,04) [83].

As condições experimentais dos resultados mostrados na Fig. 28 A foram repetidas em presença de 50 mmol L^{-1} de PEO (Fig. 28 B). Como se pode observar, os resultados também são idênticos ratificando novamente a ausência do processo de auto-associação da mistura SDoD-NaC com o polímero.

3.3. Viscosidade

A viscosidade relativa é uma técnica que permite não só determinar parâmetros tais como *cmc*, *cac* e *psp*, como também permite avaliar as mudanças estruturais dos agregados micelares e complexos polímero-surfactante em solução. A Fig. 29 mostra as mudanças na viscosidade relativa com o incremento na concentração de SDoD na ausência e em presença de PEO.

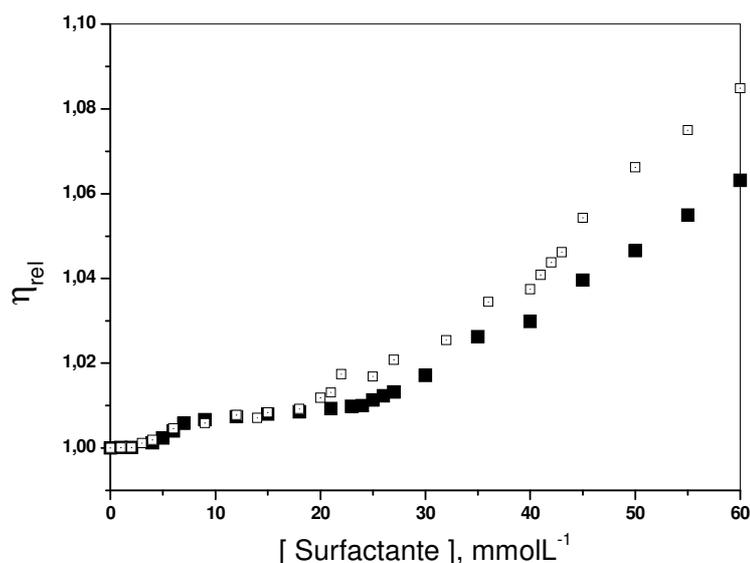


Figura 29: Viscosidade relativa vs. [SDoD] na ausência (■) e em presença de 50 mmol L⁻¹ de PEO (□).

No perfil de viscosidade relativa vs. [SDoD] nota-se a presença de duas descontinuidades, em 5,0 e 25 mmol L⁻¹, referentes a *cpa* e a *cmc* respectivamente. Estes valores são concordantes com aqueles obtidos por condutividade elétrica (Tab. 02). A adição de PEO à solução contendo SDoD, altera significativamente o perfil de η_{rel} vs. [SDoD]. Neste caso, o perfil também indica descontinuidades próximas daquelas obtidas por condutividade elétrica (Fig. 20), referentes à *cac* \approx 20 mmol L⁻¹ e ao *psp* \approx 42 mmol L⁻¹. Comparando os dois perfis, observa-se que, na região de pré-agregação são idênticos. Este resultado demonstra que a formação de pré-agregados de SDoD, independe da presença do polímero.

Apesar de o NaC ter sido extensamente investigado [14, 16, 18, 19, 74, 79], poucos estudos foram realizados por viscosidade relativa na ausência e em presença de polímeros [84, 85]. O perfil de η_{rel} vs. [NaC] (Fig. 30 A) mostra que o perfil poder ser analisado sob o ponto de vista de três regiões distintas: a primeira que se estende até 10 mmol L⁻¹ compreende a região de formação do dímero de NaC (veja a ampliação na Fig. 30 B). A segunda, que está compreendida entre 10 e \approx 30 mmol L⁻¹, é a região de formação de micelas primárias de NaC. Estes agregados são pequenos com número de agregação médio entre 4 e 6 [86]. Finalmente, a terceira região ocorre em concentrações acima de 30 mmol L⁻¹ onde se formam as micelas secundárias de NaC. Segundo Waissbluth e *et al.* [87], nesta faixa de concentração agregados primários e secundários coexistem. Os resultados indicam que isso é possível mas que, devido ao rápido incremento na viscosidade, em concentrações acima de 70 mmol L⁻¹ necessariamente há predominância de agregados do tipo secundário.

No perfil da Fig. 30, podemos observar, somente através desta técnica, todo o processo de micelização do NaC, desde a formação do dímero, passando por micelas primárias, até a formação de micelas secundárias.

Analisando o mesmo gráfico, mas em presença de PEO, observa-se que, em concentrações de NaC até $\approx 30,0 \text{ mmolL}^{-1}$, o perfil é idêntico àquele quando na ausência de PEO, denotando a incapacidade dos dímeros e micelas primárias de NaC em formar complexos com PEO. No entanto, a partir de $\approx 30,0 \text{ mmolL}^{-1}$, existe uma diferença clara nos perfis causada, possivelmente, pela formação de complexos NaC-PEO.

Os resultados de viscosidade relativa não contradizem aqueles obtidos por condutividade elétrica e os estudos realizados anteriormente [6, 74, 79], mas, antes de qualquer conclusão a respeito, algumas considerações devem ser feitas quanto à faixa de concentração analisada, às técnicas utilizadas, e, principalmente, em relação a propriedade medida:

- i. Os estudos realizados anteriormente, se restringiam a concentrações abaixo de 40 mmolL^{-1} , estando no limite de formação dos agregados NaC-PEO.
- ii. No caso da condutividade elétrica, acompanha-se a mobilidade das espécies iônicas em solução. Quando em surfactantes clássicos, as micelas tem contra-íons ligados às superfícies, algo que não acontece com o NaC. Para o NaC, os dados de condutividade elétrica indicam que suas micelas possuem valor de α próximo de 1. Deste modo, o maior contribuinte para condutividade da solução, o íon Na^+ ($\lambda^0 = 50,1 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)[79], não se ligaria na fase micelar do complexo NaC-PEO. De outro lado, a condutividade equivalente limite para o ânion colato é baixa ($\lambda^0 = 14,2 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) [79] não produzindo, portanto, grandes mudanças na condutividade elétrica da solução em condições onde ocorre micelização.
- iii. Outra técnica utilizada para estudar este sistema, é a tensão superficial [79], onde mede-se uma propriedade da superfície da solução (interface ar-líquido). Devido a baixa solubilidade de surfactantes em água, suas moléculas tentam arranjar-se de modo a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos e a água. Em consequência, os monômeros tendem a se orientar na superfície de tal forma que os grupos polares do surfactante ficam na solução aquosa, próxima da superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-ar minimizando o contato com a água. Esta primeira forma de arranjo é uma tentativa das cadeias alquílicas escaparem do efeito da repulsão da água,

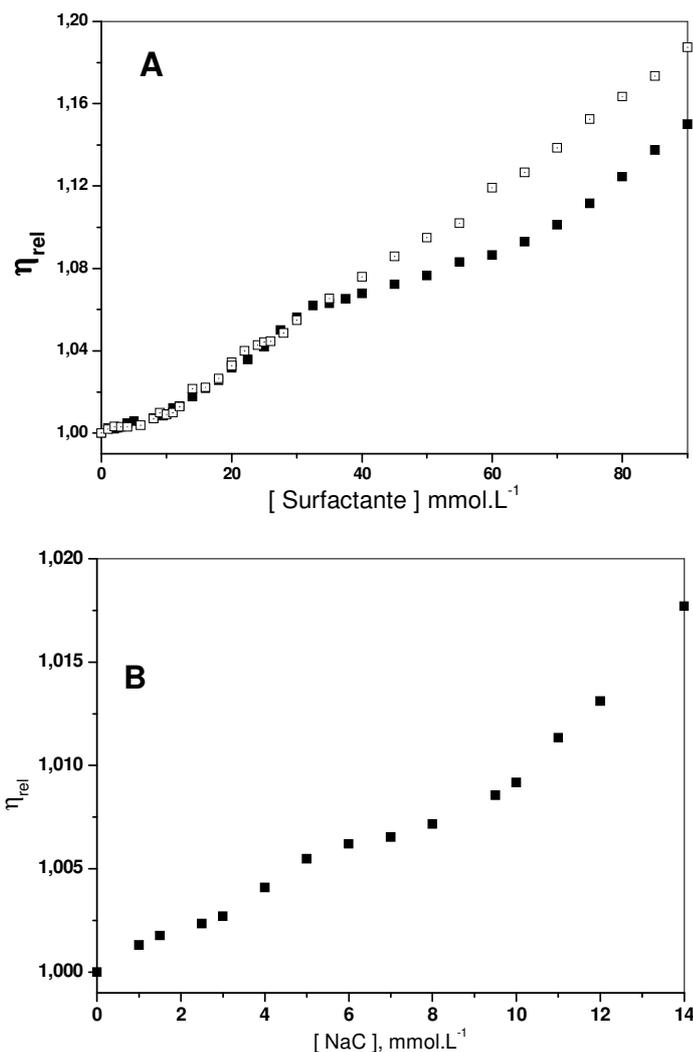


Figura 30: A – Viscosidade relativa vs. [NaC] na ausência (■) e em presença de 50 mmol L⁻¹ de PEO (□). B – Ampliação da Fig. 29 A na ausência de PEO.

estabelecendo-se na fase gasosa por que são mais solúveis nesta fase. Este fenômeno, termodinamicamente espontâneo, gera uma diminuição na tensão superficial da água e provoca uma desorganização das moléculas de água na sua superfície. Acima da *cmc*, as micelas, ao contrário dos monômeros, ficam dispersas em toda a solução, sem efeito adicional sobre a tensão superficial da solução. Assim, após a formação de micelas primárias em 10 mmolL⁻¹, a tensão na superfície da solução não se altera (51,0 dina/cm)[6], não sendo possível acompanhar a formação de micelas secundárias de NaC e a formação de agregados NaC-PEO.

- iv. Por fluorescência do pireno, acompanham-se as mudanças de polaridade do meio micelar, medindo-se a variação da emissão de fluorescência em função

da distribuição estatística das moléculas de pireno entre os sítios hidrofóbicos da fase micelar. Analisando a Fig. 28, observa-se que quando a χ_{SDoD} é zero (100% de NaC), os valores de I_1/I_3 com e sem polímeros são aproximadamente os mesmos, indicando que os sítios de ligação do pireno, em polaridade são idênticos em ambos os experimentos. Assim, esta técnica não é conclusiva a respeito da interação NaC-PEO.

Portanto, via viscosidade pode-se concluir que ocorre interação NaC-PEO, não via micelas primárias como proposto por Chistoff *et al.* [88], mas via micelas secundárias. No entanto, a formação destes agregados não deve ocorrer de maneira clássica, como para SDoD, por exemplo, onde a complexação modifica parâmetros como *cmc*, tamanho, etc. Aceita-se que formação de micelas primárias de NaC têm sua força motriz em interações hidrofóbicas, enquanto que as secundárias, formam-se por ligações de hidrogênio [22]. Assim na presença de micelas secundárias a formação de complexos NaC-PEO, ocorre provavelmente através de ligações de hidrogênio dos grupos hidroxila do NaC e os oxigênios do polímero. No entanto esta interação deve ser lábil, isto é, a interação é formada e desfeita continuamente e estatisticamente. Diante destas considerações e, pelo fato de que a viscosidade relativa mede uma propriedade intrínseca da solução, todos os dados são condizentes.

Nas misturas NaC-SDoD, os dados de *cmc* (Tab 03) obtidos são coerentes com os obtidos por condutividade elétrica. Quando adicionamos PEO à mistura, observa-se a formação de complexos somente em altas frações molares de SDoD ($\chi_{SDoD} > 0,9$), como acontece por condutividade elétrica. Nas concentrações de surfactante estudadas em altas frações molares de NaC ($\chi_{SDoD} < 0,2$), não se observa a formação de complexos com PEO.

Tabela 03: Valores de concentração micelar crítica (cmc) na ausência e em presença de 50 mmol L⁻¹ de PEO via viscosidade relativa.

χ_{SDoD}	Sem PEO (mmol L ⁻¹)	Com PEO (mmol L ⁻¹)
1,0	24,0	20,0*
0,8	17,0	18,0
0,6	14,0	13,0
0,4	13,0	12,5
0,2	12,8	12,0
0	10,0**	10,0**

*refere-se a *cac* para SDoD-PEO.

**toma como base a formação de micelas primárias.

3.4. Tratamento teórico da *cmc* das Mistura SDoD-NaC

O processo de micelização das misturas de SDoD e NaC pode ser tratado aplicando-se a teoria da *aproximação regular da solução* (RST), desenvolvida por Holland e Rubingh [10]. De acordo com este modelo, os coeficientes de atividade dos surfactantes são relacionados com um parâmetro de interação, β , que quantifica a interação líquida entre as espécies de surfactantes na micela. Valores positivos de β indicam que existe uma repulsão resultante entre os dois surfactantes componentes da micela, enquanto que valores negativos representam um processo de micelização da mistura onde ocorre atração líquida entre as espécies de surfactantes. As linhas contínuas na Figura 31 representam os valores de *cmc* das misturas estimados pela teoria da aproximação da solução regular para diferentes valores do parâmetro líquido de interação β . A linha pontilhada corresponde ao comportamento ideal da solução obtido quando $\beta = 0$. O valor médio de β , encontrado para a mistura SDoD-NaC, foi de -0,2, mas como se pode observar na Figura 31, este valor não representa corretamente os dados de *cmc* obtidos experimentalmente. O processo de micelização das misturas de SDoD-NaC mostra um desvio negativo da idealidade para frações molares de SDoD $> 0,5$, enquanto que ocorre um desvio positivo para frações molares de SDoD $< 0,5$. Uma simulação, utilizando um valor de $\beta = -1,0$, mostra-se bastante coerente com os valores experimentais de *cmc* obtidos para altas frações molares de SDoD ($\chi_{\text{SDoD}} > 0,8$), enquanto é de baixa coerência em altas frações molares de NaC. De outro lado, uma simulação com $\beta = + 0,5$ é satisfatória para baixas frações molares de SDoD ($\chi_{\text{SDoD}} < 0,4$), mas o desvio se torna grande com incrementos de SDoD à mistura. $\beta = -1,0$, representa um sistema com uma baixa atração líquida entre os monômeros, enquanto que, $\beta = + 0,5$ representa um sistema com uma baixa repulsão líquida entre estes. Desde que os surfactantes são aniônicos, a interação deve ser exclusivamente hidrofóbica. Observou-se ainda que, nos ajustes, o parâmetro líquido de interação β variou de -1,0 a 1,0 para as frações molares de SDoD de 0,9 e 0,3, indicando que a formação de micelas ricas em SDoD ocorre com maior atração entre os monômeros do que na formação de micelas ricas em NaC.

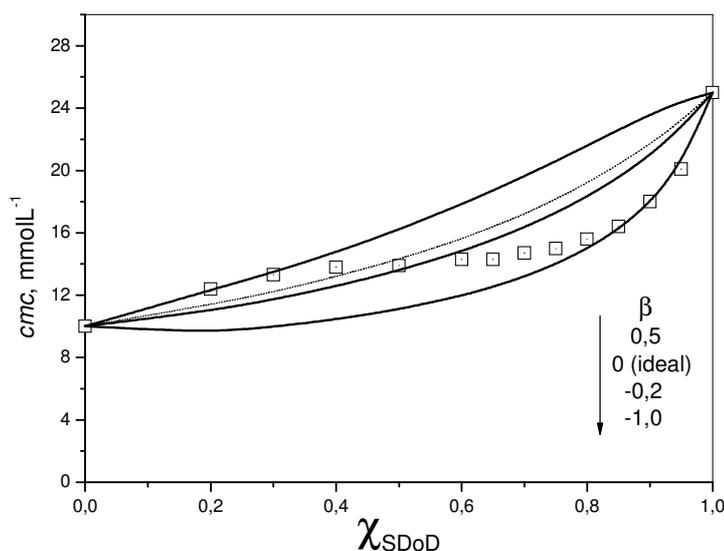


Figura 31: Variação da cmc experimental de misturas de NaC e SDoD (□) segundo a teoria da solução ideal (linha pontilhada) e segundo a teoria da solução regular (RST), para diferentes valores de β (linhas contínuas), em função da fração molar de SDoD.

A Figura 32 mostra a variação da composição das micelas mistas para diferentes misturas de SDoD-NaC em função da fração molar total de surfactante na solução, determinadas pelas teorias da solução ideal e aproximação da solução regular [11]. A linha pontilhada representa a composição micelar na qual não existe nenhuma interação entre os monômeros, ou seja, um comportamento ideal [89]. Em altas frações molares de SDoD ($\chi_{\text{SDoD}} \approx 0,8$), a teoria prediz uma absorção preferencial de monômeros de SDoD nas micelas mistas e para $\chi_{\text{NaC}} > 0,7$ as típicas micelas de NaC exibem uma composição micelar com preferência para monômeros de NaC. A composição das micelas é igual de acordo com as duas teorias para a fração molar total de SDoD na solução igual a 0,47, indicando uma micela mista com uma composição de 26 % de SDoD (Fig. 32). No entanto, de acordo com a teoria da solução regular, observa-se que a quantidade de monômeros de SDoD na micela mista para $\chi_{\text{SDoD}} < 0,47$ é inferior do que aquela prevista pela teoria da solução ideal. Já para $\chi_{\text{SDoD}} > 0,47$, a quantidade de monômeros de SDoD na micela mista é superior àquela prevista pela teoria da solução ideal. Ainda, conforme a teoria da aproximação da solução regular, na Figura 32 são destacadas três regiões distintas: Primeiro, para frações molares totais de SDoD menores do que 0,3, observa-se uma mudança rápida no perfil da composição das micelas, indicando a formação de micelas tipicamente ricas em NaC. Segundo, em frações molares de SDoD entre 0,3 e 0,8, a composição varia de forma contínua e gradativa, em concordância com um

sistema de formação de micelas mistas. Por fim, em frações molares de SDoD superior a 0,8, observa-se que estão sendo formadas micelas tipicamente ricas em SDoD.

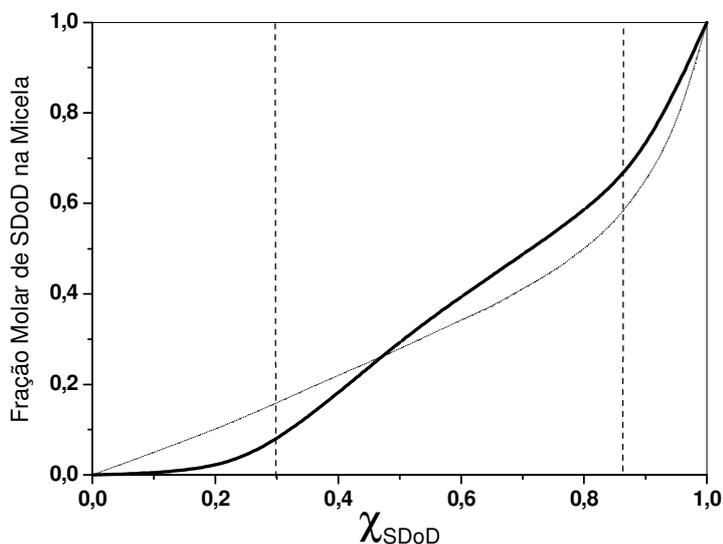


Figura 32: Variação da composição monomérica das micelas mistas segundo a teoria da solução ideal (linha pontilhada) e segundo a teoria da solução regular (linha contínua) em função da fração molar total de SDoD na solução.

3.5. Estudo Cinético

Sais biliares formam agregados micelares de diferentes estruturas e composições quando em misturas com surfactantes aniônicos clássicos e, basicamente, há duas variáveis que são predominantes na polidispersidade do sistema: concentração de NaC e fração molar da mistura [12, 74, 79]. Apesar do grande número de trabalhos envolvendo sais biliares em reações químicas [56, 57, 75, 90, 91], nenhum utiliza reações como “sonda cinética” para caracterização de diferentes estruturas em solução.

Misturas de surfactantes que possuem comportamento ideal, normalmente possuem variações próximas da linearidade em suas propriedades com a fração molar, enquanto que misturas não-ideais normalmente apresentam variações não-lineares com máximos ou mínimos. Tal comportamento se aplica a velocidade de reações, após a *cmc* misturas ideais como SDoD e SDS (dodecil sulfato de sódio) apresentam variação linear nas constantes de velocidade observadas (k_{obs}) [54], enquanto que misturas não-ideais como SDoD e sulfobetainas apresentam máximos nos perfis de k_{obs} vs. fração molar de surfactante [41].

3.5.1. Hidrólise do Acetato de *p*-Nitrofenol

Todas as cinéticas para a reação de hidrólise do PNPA apresentaram perfil típico de primeira ordem, como apresentado na Figura 16. Inicialmente estudou-se a hidrólise do PNPA em diferentes frações molares de SDoD mantendo-se constante a concentração total de surfactante ($[SDoD]+[NaC]$) na ausência e em presença de PEO (Fig. 33).

A Figura 33 A apresenta a variação de k_{obs} vs. fração de SDoD em diferentes concentrações de surfactante. Em sua interpretação devem-se levar em conta os valores de *cmc* apresentados anteriormente (Tabelas 02 e 03) e as discussões na seção 3.4. Como esperado, o perfil de k_{obs} vs. fração molar de SDoD apresenta um máximo entre 0,8 e 0,9 indicando a não idealidade da mistura.

Observam-se três regiões distintas na Figura 33 A. A primeira que compreende $\chi \leq 0,2$, onde k_{obs} praticamente não varia com a concentração de surfactante. Menger e McCreery [91] investigaram a hidrólise de diferentes ésteres de *p*-nitrofenila em presença de ácido cólico em valores de $pH > 10,00$ e, como no presente estudo, observaram pouca variação na constante de velocidade para a hidrólise do PNPA com aumento da concentração de NaC. Em seu trabalho demonstraram que a constante de associação entre os substratos e os sais biliares aumentava com o tamanho da cadeia alquílica dos ésteres, explicando o pouco efeito em k_{obs} com o incremento da concentração de sal biliar para o PNPA. Nesta região a composição dos agregados micelares está rica em monômeros de NaC (Fig. 32), assim o comportamento esperado de k_{obs} é exatamente o apresentado, pouca alteração.

A segunda região compreende a frações de 0,2 até próximo de 0,9. Nesta região o aumento na concentração de surfactante produz efeito significativo em k_{obs} . Em baixas concentrações (15 e 25 $mmolL^{-1}$) o comportamento praticamente não se altera, porém o valor de k_{obs} aumenta com relação ao daquele somente em presença de tampão ($2,24 \times 10^{-4} s^{-1}$). Como pode ser observado nas Tabelas 02 e 03, na concentração de 15 $mmolL^{-1}$ a *cmc* das diversas frações molares da mistura estão sendo atingidas ou muito próximas a esta, o que provoca pouca variação no k_{obs} . Em 80 $mmolL^{-1}$ de surfactante, k_{obs} aumenta linearmente com a fração molar de SDoD, atingindo o valor máximo entre 0,8 e 0,9 de SDoD. Esta região compreende micelas mistas de NaC-SDoD e sua composição também varia linearmente com a fração molar (Fig. 32).

Finalmente, a terceira região compreende frações ricas na sua composição em SDoD ($\approx 0,9$ até 1,0 de SDoD). Para a fração de SDoD 1,0, nas concentrações abaixo ou no limite de sua *cmc*, os valores de k_{obs} são idênticos, porém mais alto do que na ausência de

surfactante. Isto se deve a capacidade deste surfactante formar pré-agregados, como discutido anteriormente (seções 3.1 e 3.3). Não foram observadas nas demais frações indícios de que os pré-agregados interferissem na velocidade da reação, o que sugere predominância de NaC na sua composição. Em 80 mmolL^{-1} de surfactante, o valor de k_{obs} diminui até χ_{SDoD} 1,0, indicando o predomínio de SDoD na composição das micelas nesta região.

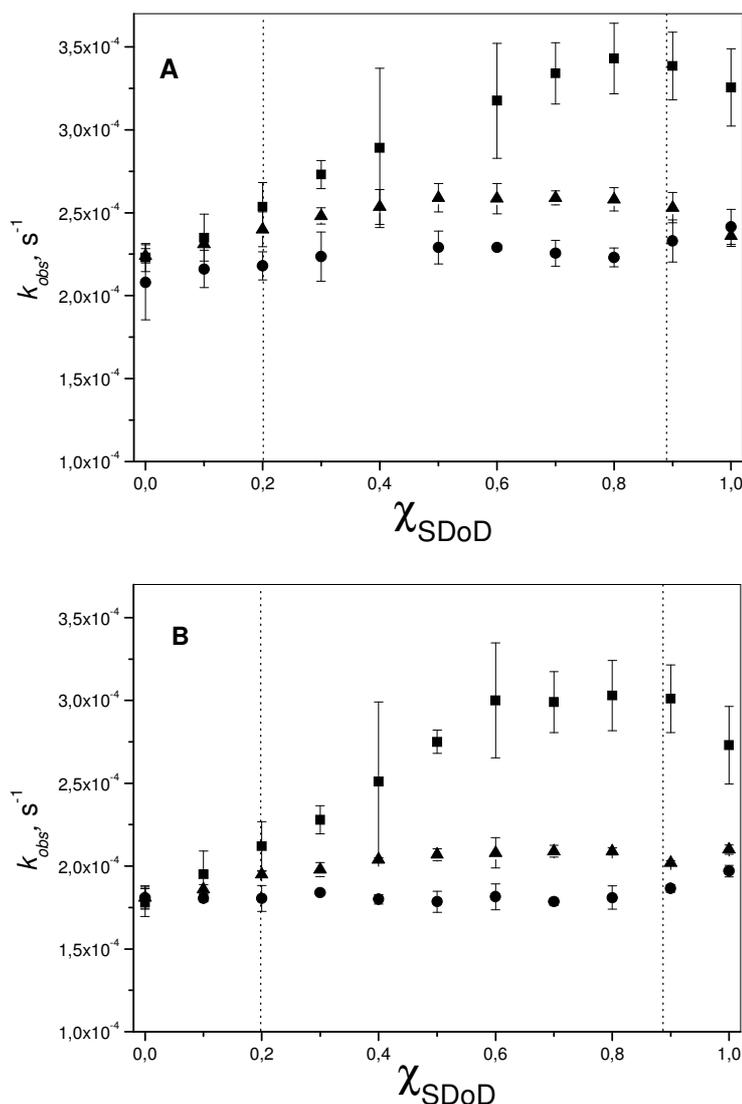


Figura 33: Perfis de k_{obs} vs. χ_{SDoD} na ausência (A) e em presença de 50 mmolL^{-1} de PEO (B), para PNPA. Em (●) 15, em (▲) 25, em (■) 80 mmolL^{-1} de surfactante.

Os resultados em presença de polímero são praticamente idênticos aqueles na ausência de PEO. Para SDoD puro, a pequena diferença nos valores de k_{obs} nas concentrações de 15 e 25 mmolL^{-1} mostram a capacidade deste surfactante em se associar com PEO, visto que em sua ausência os valores de k_{obs} são idênticos. Para NaC puro, os resultados mostram que mesmo em condições onde os agregados NaC-PEO se formam, estes não influenciam a

velocidade da reação. No caso das misturas, como esperado, os perfis não se alteram denotando novamente a ausência de associação cooperativa entre estes e o PEO. Contudo, apesar dos perfis não sofrerem alterações, a hidrólise do PNPA parece ser afetada pelo polímero. Estudou-se, então, a influência do PEO na hidrólise do PNPA (Fig. 34).

Observa-se na Figura 34 que o valor de k_{obs} diminui com a concentração de PEO. Este efeito deve-se provavelmente a natureza do intermediário tetraédrico (Fig. 08) formado na reação, que nas condições de pH deste estudo (9,00), possui carga negativa, que pode estar sendo desestabilizada pelo grande número de átomos de oxigênio (pares de elétrons livres) presentes ao longo da cadeia polimérica.

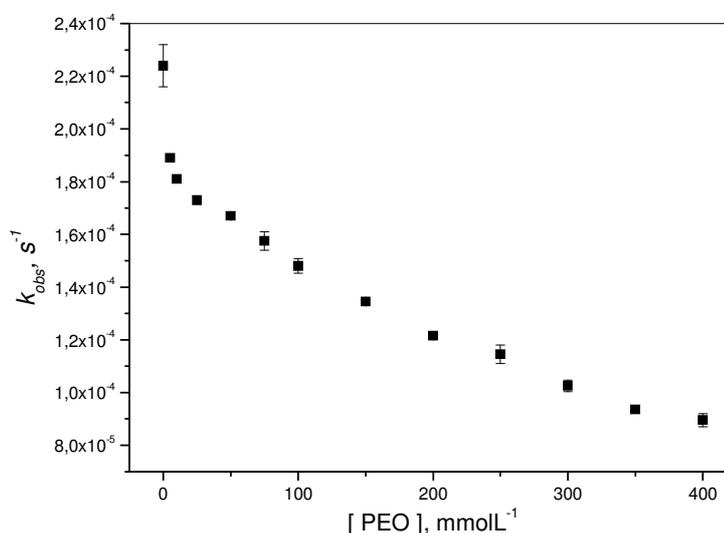


Figura 34: k_{obs} vs. [PEO] para a hidrólise do PNPA.

3.5.2. Desprotonação do 5-Nitrobenzisoaxazol (Reação de Eliminação de Kemp)

Assim como para o PNPA, todas as cinéticas para a reação de hidrólise do 5-NBI apresentaram perfil típico de primeira ordem, como apresentado na Figura 16. A Figura 35 apresenta a variação de k_{obs} vs. fração molar de SDoD em diferentes concentrações de surfactante ([SDoD]+[NaC]) constante) na ausência e em presença de PEO.

Na interpretação da Fig. 35 A, os dados de cmc obtidos anteriormente (Tab. 02 e 03) se fazem necessários. Assim como acontece com o substrato PNPA, em concentrações próximas a cmc e/ou pouco acima destas, a variação de k_{obs} é pequena ou inexistente em 15 e 25 mmolL⁻¹. Comparando as Fig. 35 A e B, observa-se que nestas concentrações os perfis são

similares até próximo de 0,9 de SDoD, onde há uma ligeira diferença em 25mmolL^{-1} associada a formação de agregados polímero-surfactante.

Em 80mmolL^{-1} de surfactante, em todas as frações molares ocorreu incremento na velocidade da reação com relação ao valor obtido somente em presença de tampão, e como acontece para o PNPA, o perfil apresenta três regiões distintas. A primeira região vai de 0 até 0,2 de SDoD, nesta região k_{obs} mantêm-se aproximadamente constante. Este comportamento está associado com a composição do sistema, nesta região há predominância de monômeros de NaC na composição dos agregados micelares (Fig. 32). A segunda região vai de 0,2 até 0,8, onde k_{obs} aumenta consideravelmente com a fração molar denotando a formação de micelas mistas de SDoD-NaC. Após 0,8 de SDoD, k_{obs} mantêm-se praticamente constante até

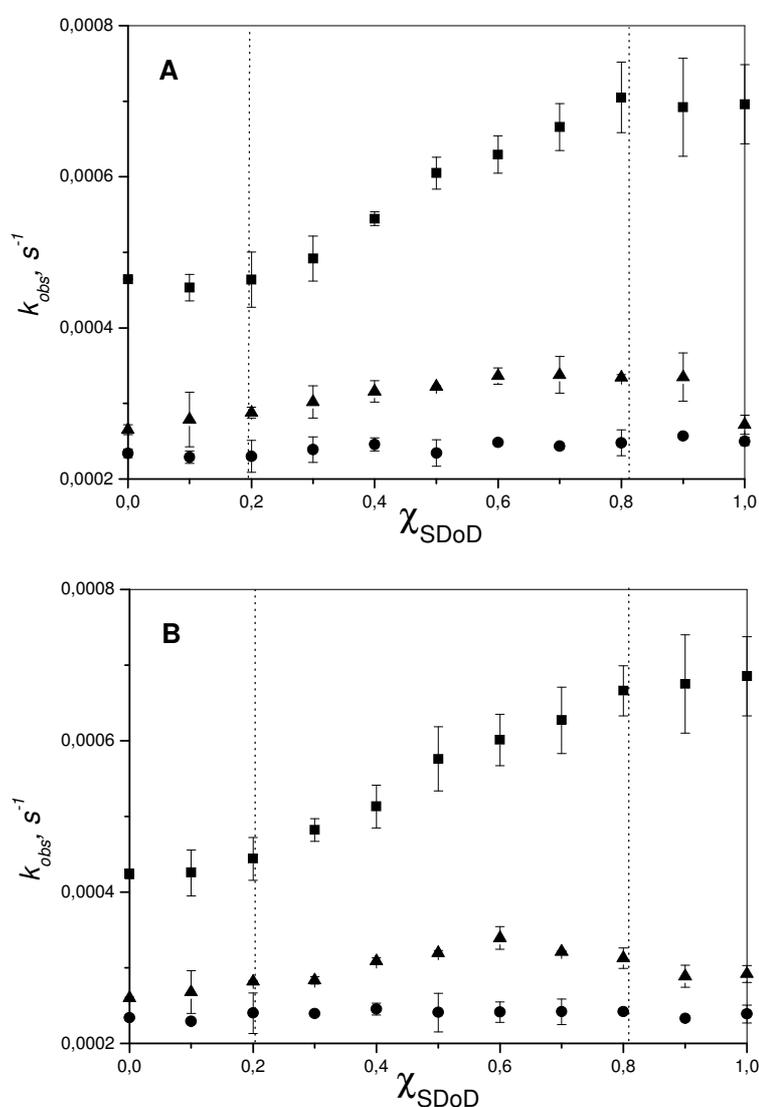


Figura 35: Perfis de k_{obs} vs. da χ SDoD na ausência (A) e em presença de 50mmolL^{-1} de PEO (B), para 5-NBI. Em (●) 15, em (▲) 25, em (■) 80mmolL^{-1} de surfactante.

1,0 de SDoD, mostrando que nesta região a composição dos agregados micelares é predominantemente composta por monômeros de SDoD. Em presença de PEO (Fig. 35B) o perfil não sofre alterações significativas, demonstrando que os sítios de ligação do substrato nos agregados micelares não são afetados pelo polímero.

A desprotonação de Kemp é mais lenta em micelas do que vesículas, visto que micelas contêm mais água na camada de Stern [63, 64]. Assim variação observada em k_{obs} vs. χ_{SDoD} está associada com a composição da camada de Stern, que por sua vez depende da composição dos agregados micelares. A quantidade de água na camada de Stern depende da classe a qual o surfactante pertence (Tab. 01) e do tipo de contra-íon e sua interação com a superfície micelar (no caso de surfactantes iônicos). Assim, o grau de ionização micelar (α) torna-se uma propriedade útil para estimar a composição da camada de Stern.

Como discutido anteriormente (seção 3.1.1), o valor de α para o sistema SDoD-NaC varia de 0,4 (SDoD) até \approx 0,9 (NaC). Estes valores refletem o tipo de agregado micelar formado, no caso do SDoD uma micela esférica clássica com vários contra-íons ligados, enquanto que para o NaC a micelização ocorre em vários estágios tendo como referência seu dímero (Fig. 07) e suas micelas não ligam contra-íons. No caso de suas misturas, os valores de α são intermediários aos componentes puros, assim como a sua composição e forma.

A Figura 36 apresenta a variação de α e k_{obs} (em 80mmolL^{-1}) com fração molar de SDoD. Nota-se que k_{obs} aumenta com o decréscimo de α , ou seja, a velocidade da reação aumenta na medida em que mais contra-íons estão ligados a superfície micelar. Isto deve-se provavelmente a um ou a soma dos seguintes efeitos:

- i. A micelização induz o aumento na entropia da superfície micelar, ou seja, diminui a organização das moléculas de água ao redor micela, dessolvatando a base e deixando-a “mais livre” para desprotonar o substrato. Neste caso, como as micelas são iônicas, a presença do contra-íon contribui para o aumento na entropia e dessolvatação da base, explicando o maior incremento em k_{obs} a medida que α diminui;
- ii. A maior concentração de contra-íons na camada de Stern e na dupla camada difusa de Goy Chapman do que resto da solução estabilizam melhor a carga negativa dos íons hidróxidos, aumentando sua concentração em regiões próximas ao ambiente micelar.

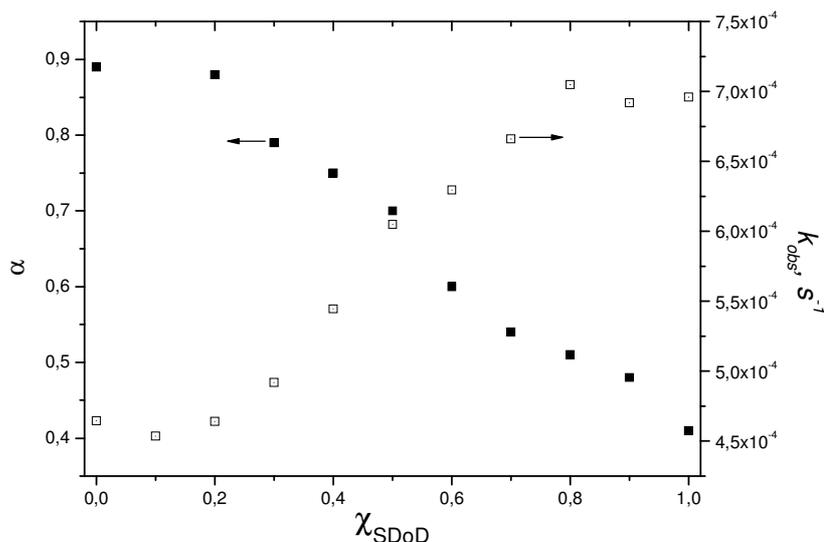


Figura 36: Grau de ionização micelar (■) e k_{obs} em 80mmolL^{-1} de surfactante (□) vs. χ_{SDoD} .

3.6. Modelo Micelar para as Mistura SDoD-NaC-PEO

A Figura 37 ilustra um esquema das várias fases do sistema SDoD-NaC-PEO derivado dos resultados obtidos neste trabalho.

A interpretação pode ser resumida da seguinte forma:

- i. Em baixas frações molares de SDoD ($<0,2$), o modelo é consistente com aquele já descrito por Ueno e colaboradores [86] para misturas de NaC e surfactante não-iônico. Aqui também, no sistema binário SDoD-NaC e ternário PEO-SDS-NaC, os agregados de NaC são descritos por uma geometria que contém a estrutura rígida do anel esteroidal com os grupos hidroxilas (área clara) voltados à fase aquosa e tanto as moléculas de pireno como os grupos alquilas do SDoD incorporados dentro (área escura) das micelas primárias típicas de NaC. Em presença de PEO, nesta região o polímero em solução é descrito como estando livre dos agregados micelares.

Para NaC puro, os resultados apontam a existência de micelas primárias e secundárias, e a formação destes depende essencialmente da concentração de NaC. Quando PEO é adicionado, os resultados indicam a inexistência de interação polímero-surfactante com micelas primárias de NaC. No entanto, os resultados de viscosidade indicam que micelas secundárias de NaC interagem com o polímero (seção 3.3).

- ii. A segunda região que compreende $\chi_{\text{SDoD}} > 0,2$ até $\approx 0,9$, sugere-se o desenvolvimento de micelas tipicamente mistas definido por valores constantes de *cmc* (Tab. 02 e 03). Nesta região, na ausência e em presença de PEO, os valores de *cmc* são idênticos (Figs. 23, 26, 27 e Tab. 03). Este fato exclui a possibilidade da existência de agregados polímero-surfactante. Nesta fase da discussão, pode-se especular que os incrementos de surfactante contribuem somente para o aumento da concentração de micelas mistas. Recorda-se que os valores constantes de *cmc* das misturas implicam na existência de agregados com estruturas micelares semelhantes, sendo confirmado pelos perfis de I_1/I_3 vs. χ_{SDoD} que não apresentam mudanças abruptas de polaridade em altas concentrações de surfactante (Fig. 28).
- iii. Finalmente a terceira região, acima de 0,9 de SDoD, predomina o agregado micelar rico em monômeros de SDoD que associa cooperativamente com PEO. A existência dessa associação está baseada nas diferenças encontradas no valor de *cmc* na ausência e em presença de PEO (Figs. 23 e 27), e evidências obtidas nos estudos cinéticos (Figs. 33 e 35)

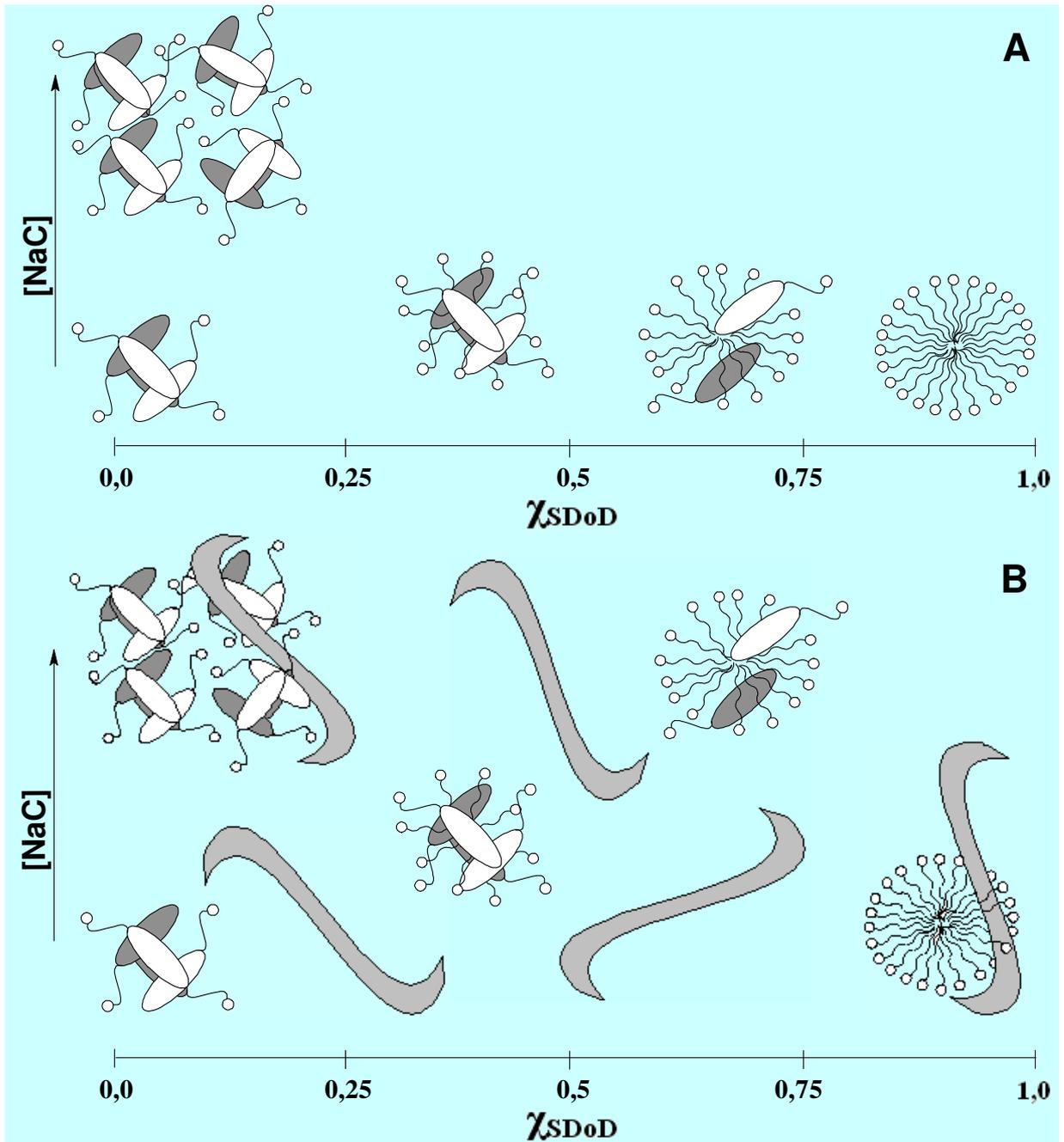


Figura 37: Representação esquemática para estruturas mistas NaC-SDoD (A) e NaC-SDoD-PEO (B) em função da fração molar de surfactante.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

Através das técnicas utilizadas neste trabalho, para o colato de sódio, não se observou variação dos resultados de condutividade elétrica, de fluorescência do estado estacionário do pireno e viscosidade relativa, quando em presença e na ausência de PEO em baixas concentrações de NaC. Este fato foi usado como argumento para concluir que o PEO não tem a habilidade de induzir associação cooperativa com micelas primárias de NaC. Aumentando a concentração de NaC, via viscosidade relativa, observou-se que micelas secundárias de NaC se associam com PEO, mas esta associação não é do tipo clássica, onde parâmetros como *cmc* ou tamanho dos agregados são modificados e a força motriz é hidrofóbica. Sugere-se que esta interação tem como força motriz interações hidrofílicas e é lábil, ou seja, forma-se e desfaz-se continuamente e estatisticamente.

Com a adição de SDoD à mistura contendo NaC e PEO, mesmo em diferentes concentrações do polímero, conclui-se que a formação dos complexos mistos, PEO-SDoD-NaC, ocorre somente em altas frações molares de SDoD, maiores do que 0,9. Em frações menores do que 0,9, postula-se que os agregados formados são mistos de SDoD e de NaC cujas estruturas e composição micelar dependem da composição da mistura.

Observou-se ainda que, em baixas concentrações da mistura dos surfactante (2,0 a 5,0 mmol L⁻¹), os resultados de condutividade elétrica e viscosidade indicam a existência da formação de pré-agregados em todas as frações molares e, quando em presença do polímero, ele parece não exibir influência na formação destes pré-agregados.

Os dados de micropolaridade indicam a formação de micelas primárias e secundárias do surfactante colato de sódio. Este comportamento ocorre até frações molares de 0,2 de SDoD, onde os agregados micelares ainda são tipicamente de NaC.

Tanto a hidrólise do PNPA e como a desprotonação do 5-NBI demonstraram ser bons métodos para caracterizar os diferentes agregados micelares do sistema SDoD-NaC. A desprotonação do 5-NBI, como esperado, mostrou-se mais sensível as alterações dos agregados micelares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. W. Atkins, L. Jones, *Princípios de Química*, Bookman Companhia Editora, Porto Alegre, 2005.
- [2] D. J. Shaw, *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*, Edgard Blücher, São Paulo, 1975.
- [3] J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley-Interscience, New York, 1982.
- [4] J. H. Fendler, *Pure and Applied Chemistry* 54 (1982) 1809 - 1817.
- [5] F. C. Lima, *Investigação de complexos mistos Polímeros-Surfactantes em Misturas de Dodecil Sulfato de Sódio e Decil Fosfato de Sódio com Poli(óxido de Etileno)*, in: Departamento de Química, vol Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, 1998.
- [6] A. C. Felipe, *Auto-Associação do Colato de Sódio (NaC) em Misturas com o Surfactante Aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e o Polímero Neutro Hidrossolúvel poli(óxido de etileno) (PEO)*. in: Departamento de Química, vol Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2006.
- [7] N. Maniasso, *Química Nova* 24 (2001) 87 - 93.
- [8] T. Rabocai, *Físico-Química de Superfície*, Organização dos Estados Americanos, Washington, 1979.
- [9] J. F. Scamehorn, *Phenoma in Mixed Surfactant Systems- Chapter 1*, American Chemical Society, Washington, 1986.
- [10] P. M. Holland, D. N. Rubingh, *Journal of Physical Chemistry* 87 (1983) 1984 - 1990.
- [11] P. M. Holland, D. N. Rubingh, *Mixed Surfactants Systems - Chapter 1*, American Chemical Society, Washington, 1992.

- [12] R. Eising, S. Morés, I. C. Bellettini, A. C. Felipe, A. Dal Bó, D. Zanette, *Química Nova* 31 (2008) 2065 - 2070.
- [13] S. Gouin, X. X. ZHU, *Langmuir* 14 (1998) 4025 - 4029.
- [14] A. Hildebrand, P. Garidel, R. Neubert, A. Blume, *Langmuir* 20 (2004) 320 - 328.
- [15] R. R. Roepke, H. L. Mason, *Journal of Biological Chemistry* 133 (1940) 103 - 108.
- [16] C. J. O'Connor, B. T. Ch'ng, R. G. Wallace, *Journal of Colloid and Interface Science* 95 (1983) 410 - 419.
- [17] S. Reis, C. G. Moutinho, C. Matos, B. de Castro, P. Gameiro, J. L. Lima, *Analytical Biochemistry* 334 (2004) 117 - 126.
- [18] D. M. Small, S. A. Penkett, D. Chapman, *Biochimica and Biophysic Acta* 176 (1969) 178 - 189.
- [19] D. G. Oakenfull, L. R. Fisher, *Journal of Physical Chemistry* 81 (1977) 1838 - 1841.
- [20] R. Zana, D. Guveli, *Journal of Physical Chemistry* 89 (1985) 1687 - 1690.
- [21] J. P. Kratochvil, W. P. Hsu, D. I. Kwok, *Langmuir* 2 (1986) 256 - 258.
- [22] D. M. Small, *Advances in Chemistry Series* 84 (1968) 31 - 51.
- [23] M. A. d. S. Spinacé, M. A. De Paoli, *Química Nova* 28 (2005) 65 - 72.
- [24] D. Avnir, *The Fractal Approach to Heterogeneous Chemistry, Surfaces, Colloids, Polymers*, Wiley, Chichester, 1989.
- [25] S. V. Canevarolo Jr, *Ciência dos Polímeros*, Ed. Artliber, São Paulo, 2002.
- [26] S. Nilsson, C. Holmberg, L. Sundelof, *Colloid and Polymer Science* 273 (1995) 83 - 95.
- [27] D. Zanette, V. Frescura, *Colloids and Surfaces* 213 (1999) 379 - 385.

- [28] E. D. Goddard, K. P. Ananthapadmanabhan, *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [29] I. Nahringbauer, *Langmuir* 13 (1997) 2242 - 2249.
- [30] C. Holmberg, S. Nilsson, L. Sundelof, *Langmuir* 13 (1997) 1392 - 1399.
- [31] G. Karlstrom, B. Lindman, *Organized Solutions: Surfactants in Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1992.
- [32] M. Nitschke, G. M. Pastore, *Química Nova* 25 (2002) 772 - 776.
- [33] K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons Ltda, Chichester, 2002.
- [34] S. M. Yang Roe, T. D. Prickett, D. L. Brautigan, D. Barford, *Biochemistry* 46 (2007) 8807 - 8815.
- [35] D. M. Vriezema, M. C. Aragonè's, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chemical Reviews* 2005 (2005) 1445 - 1489.
- [36] G. Oehme, *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic compounds: A Comprehensive Handbook in Three Volumes*, Ed. VCH, Weinheim, 2002.
- [37] C. A. Bunton, *Kinetics and Catalysis in Microheterogeneous Systems*, Marcel Dekker, New York, 1991.
- [38] J. H. Fendler, E. J. Fendler, *Catalysis in Micelles and Macromolecular Systems*, Academic Press, London, 1975.
- [39] J. E. Klijn, J. B. F. N. Engberts, *Organic and Biomolecular Chemistry* 2 (2004) 1789-1799.

- [40] D. Zanette, C. F. Lima, A. A. Ruzza, A. T. N. Belarmino, S. D. Santos, V. L. A. Frescura, D. M. O. Marconi, S. J. Froehner, *Colloids And Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 147 (1999) 89-105.
- [41] V. L. A. Frescura, D. M. O. Marconi, D. Zanette, F. Nome, A. Blasko, C. A. Bunton, *Journal of Physical Chemistry* 99 (1995) 11494-11500.
- [42] C. J. Oconnor, R. G. Wallace, *Journal Of Colloid And Interface Science* 102 (1984) 539-547.
- [43] W. D. Harkins, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1428-1444.
- [44] F. M. Menger, J. U. Rhee, H. K. Rhee, *J. Org. Chem.* 40 (1975) 3803-3805.
- [45] A. Rabion, R. M. Buchanan, J.-L. Seris, R. H. Fish, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 116 (1997) 43 - 47.
- [46] G. Oehme, I. Grassert, E. Paetzold, H. Fuhrmann, T. Dwars, U. Schmidt, I. Iovel, *Kinetics and Catalysis* 44 (2003) 766-777.
- [47] F. Bougard, C. Giacomelli, L. Mespouille, R. Borsali, P. Dubois, R. Lazzaroni, *Langmuir* 24 (2008) 8272-8279.
- [48] D. Lanson, M. Schappacher, R. Borsali, A. Deffieux, *Macromolecules* 40 (2007) 9503-9509.
- [49] S. Jain, F. S. Bates, *Science* 300 (2003) 460-464.
- [50] K. Naka, Y. Kubo, A. Ohki, S. Maeda, *Polymer Journal* 26 (1994) 243-249.
- [51] I. W. Hamley, *Nanotechnology* 14 (2003) 39 - 54.
- [52] F. Avenier, J. B. Domingos, L. D. Van Vliet, F. Hollfelder, *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007) 7611-7619.

- [53] L. Martins, D. Cardoso, *Química Nova* 29 (2006) 358-364.
- [54] D. M. O. Marconi, V. Frescura, D. Zanette, F. Nome, *Journal of the Physical Chemistry* 98 (1994) 12415 - 12419.
- [55] B. S. Lee, F. Nome, *Langmuir* 16 (2000) 10131 - 10136.
- [56] C. J. O'Connor, R. G. Wallace, *Journal of Colloid and Interface Science* 102 (1984) 539-547.
- [57] C. J. O'Connor, R. G. Wallace, *Eur. J. Biochem* 141 (1984) 379-383.
- [58] A. Williams, *Biochemistry* 9 (1970) 3383-3390.
- [59] A. R. Fersht, *Journal of the American Chemical Society* 93 (1971) 3504 - 3515.
- [60] E. C. Lucas, M. Caplow, *Journal of the American Chemical Society* 94 (1972) 960 - 963.
- [61] W.-H. Hung, C.-C. Hu, C.-Y. Liu, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 112 (1996) 1 - 7.
- [62] D. S. Kemp, M. L. Casey, *Journal of the American Chemical Society* 95 (1973) 6670-6680.
- [63] J. Perez-Juste, F. Hollfelder, A. J. Kirby, J. B. F. N. Engberts, *Org. Lett.* 2 (2000) 127-130.
- [64] J. E. Klijn, J. B. F. N. Engberts, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 1825-1833.
- [65] D. Zanette, A. A. Ruzza, S. J. Froehner, E. Minatti, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 108 (1996) 91-100.
- [66] C. F. Lima, F. Nome, D. Zanette, *Journal of Colloid and Interface Science* 187 (1997) 396-400.

- [67] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson Learning, São Paulo, 2006.
- [68] R. Zana, *Mixed Surfactant Solutions - Chapter 12*, Marcel Dekker, New York, 1993.
- [69] H. Hoffmann, H. Rehage, *Surfactants Solutions - Chapter 4*, Marcel Dekker, New York, 1987.
- [70] D. Stigter, *J. Phys. Chem.* 70 (1966) 1323-1325.
- [71] M. Kodama, M. Miura, *Bulletin of Chemical Society of Japan* 45 (1972) 2265 - 2269.
- [72] R. J. Robson, E. A. Dennis, *J. Phys. Chem.* 81 (1977) 1075-1078.
- [73] B. Schweitzer, A. C. Felipe, A. Dal Bó, E. Minatti, D. Zanette, A. Lopes, *Journal of Colloid and Interface Science* 298 (2006) 457 - 466.
- [74] A. C. Felipe, B. Schweitzer, A. G. Dal Bó, R. Eising, E. Minatti, D. Zanette, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 294 (2007) 247 - 253.
- [75] C. Lauridsen, M. S. Hedemann, S. K. Jensen, *Journal of Nutritional Biochemistry* 12 (2001) 219-224.
- [76] M. L. Casey, D. S. Kemp, K. G. Paul, D. D. Cox, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 2294-2301.
- [77] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, 1988.
- [78] G. Stokker, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 2613-2615.
- [79] D. Zanette, A. C. Felipe, B. Schweitzer, A. Dal Bó, A. Lopes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 279 (2006) 87 - 95.
- [80] V. Frescura, D. Zanette, *Journal of Colloid and Interface Science* 213 (1999) 379-385.

- [81] F. Petit-Agnely, I. Iliopoulos, R. Zana, *Langmuir* 16 (2000) 9921-9927.
- [82] C. Bohne, O. Rinco, M. C. Nolet, R. Ovans, *Photochemical and Photobiological Science* 2 (2003) 1140-1151.
- [83] K. Kalyanasundaran, J. K. Thomas, *Journal of the American Chemical Society* 99 (1977) 2039 - 2044.
- [84] R. M. Martins, C. A. d. Silva, C. M. Becker, D. Samios, M. Christoff, C. I. D. Bica, *Journal of Brazilian Chemical Society* 17 (2006) 994-953.
- [85] R. M. Martins, C. A. d. Silva, C. M. Becker, D. Samios, M. Christoff, C. I. D. Bica, *Colloid and Polymer Science* 284 (2006) 1353-1361.
- [86] M. Ueno, Y. Kimoto, Y. Ikeda, H. Momose, R. Zana, *Journal of Colloid and Interface Science* 117 (1987) 179-186.
- [87] O. L. Waissbluth, M. C. Morales, C. Bohne, *Photochemistry and Photobiology* 82 (2006) 1030-1038.
- [88] M. Christoff, N. P. d. Silveira, D. Samios, *Langmuir* 17 (2001) 2885-2888.
- [89] K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, John Wiley & Sons Ltda, Chichester, 2004.
- [90] H. A. Zahalka, P. J. Dutton, B. O'Doherty, T. A. M. Smart, J. Phipps, D. O. Foster, G. W. Burton, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2797-2799.
- [91] F. M. Menger, M. J. McCreery, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 121-126.